

Heterozyklische Duftstoffe aus
Corynebacterium glutamicum, *Trichoderma*, *Fusarium fujikuroi* und
Geniculosporium
und
der Beitrag der Monooxygenasen
aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 zur Gibberellin Biosynthese

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Susanne Maren Wickel
aus Offenbach am Main

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jeroen S. Dickschat

2. Referent: Prof. Dr. Stefan Schulz

eingereicht am: 22.10.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.01.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

S. M. Wickel, C. A. Citron, J. S. Dickschat, *Novel 2H-Pyran-2-ones from Trichoderma viride and Trichoderma asperellum*, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2906-2913.

C. A. Citron, S. M. Wickel, B. Schulz, S. Draeger, J. S. Dickschat, *A Diels-Alder / Retro-Diels-Alder Approach for the Enantioselective Synthesis of Microbial Butenolides* *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6636-6646.

J. S. Dickschat, S. Wickel, C. J. Bolten, T. Nawrath, S. Schulz, C. Wittmann, *Pyrazine Biosynthesis in Corynebacterium glutamicum*, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2687-2695.

Tagungsbeitrag

S. M. Wickel, J. S. Dickschat: *Bacterial Gibberellin Biosynthesis*. Vortrag. 1. Warberg Symposium on Natural Products Chemistry, NTH Bottom-up Symposium, Warberg (2011).

Posterbeitrag

S. M. Wickel, C. A. Citron, J. S. Dickschat: *Volatile lactones from fungi*. (Poster) 7. VAAM, Bonn (2011).

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jeroen S. Dickschat für die Überlassung der interessanten Themen und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Vielen Dank auch für eine hervorragende fachliche Betreuung, eine dauerhaft offene Tür für Fragen und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Für die Anfertigung des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Schulz. Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sei Prof. Dr. Peter Winterhalter an dieser Stelle gedankt.

Für Korrekturlesen bedanke ich mich herzlich bei Dr. Alexander Neumann, Dr. Christian A. Citron, Patrick Rabe, Ulrike Groenhagen, Julia Kiefer und Chris Petereit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe mit Dr. Nelson L. Brock, Dr. Christian A. Citron, Dr. Ramona Riclea, Hilke Bruns, Patrick Rabe, Silvia Klotz, Norman Kaufmann, Henning Kuhz, Tao Wang, Claudia Zell, Julia Gleitzmann, Gianni Laurenzano, Lena Barra, Tim Klappschinski, Immo Burkhardt danke ich für eine schöne Atmosphäre, Hilfsbereitschaft und Zusammenhalt. Es hat riesigen Spass gemacht mit euch!

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schulz und seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit unzählige GC-MS und GC-FID sowie LC-MS Messungen durchführen zu dürfen.

Ein weiteres Dankeschön gilt der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Kerstin Ibrom für die Aufnahme vieler NMR-Spektren. Bei der Abteilung für Massenspektrometrie unter der Leitung von Dr. Ulrich Papke bedanke ich mich sehr für die Aufnahme von hochauflösenden Spektren. Dr. Till Beuerle sei für fachliche GC-Beratung gedankt.

Weiterhin möchte ich mich beim technischen Personal insbesondere Herrn Schröpfer, Herrn Gebhardt und Herrn Kurz für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der etwas spezielleren Synthesen bedanken.

Ein dickes Dankeschön für tatkräftige Unterstützung gilt meinen Praktikanten Andre Baudler, Ann-Christin Fecker, Christoph Franke, Tim Gauger, Katrin Gualato, Torben Jäger, Kristof Jess, Marco Monecke und Andrea Schmidt-Meier.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie und meinen Freunden für viel Verständnis und Unterstützung bedanken.

MEINEM VATER

Peter Wickel

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Duftstoffprofile von dem Bacterium *Corynebacterium glutamicum*, den Schimmelpilzen *Fusarium fujikuroi*, *Trichoderma viride* und *Trichoderma asperellum* sowie *Geniculosporium* sp. 9910 mittels der CLSA-Methode gesammelt oder mit Lösemittel extrahiert und via GC-MS analysiert.

Die Analyse des Duftstoffprofils von *C. glutamicum* zeigte in seiner Zusammensetzung unterschiedliche Pyrazin- und Acyloinderivate, die über Synthese von Referenzsubstanzen sowie kommerziell erhältlichen Standards nachgewiesen werden konnten. Zur Aufklärung der Biosynthese der verschiedenen Pyrazinderivate wurden Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorläufern durchgeführt sowie die Duftstoffprofile von Knockout Mutanten des Primärmetabolismus in Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig ermittelt.

Die Flüssigextraktion von *Fusarium fujikuroi* zeigte nach GC-MS-Analyse verschiedene Pyridinderivate, von denen Fusarinsäure nach Datenbankvergleich identifiziert werden konnte. Eine neue Syntheseroute zu Fusarinsäure wurde entwickelt, die mit einer eisenkatalysierten Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER ausgehend von 2,5-Dichlorpyridin zwei Regioisomere lieferte. Anschließende Carbonylierung brachte den Fusarinsäuremethylester hervor, der nach Verseifung das Produkt lieferte. Das Decarboxylierungsprodukt 3-Butylpyridin konnte ebenfalls durch Kreuzkupplung von Chlorpyridin erhalten werden. Das Homoallylpyridin verbleibt nur als tendenziell identifiziert. Die Fütterung von [2-¹³C]Acetat lieferte eine Einbaurate in 3-Butylpyridin von 5,8 %.

Die Bodenzpilze *T. viride* und *T. asperellum* zeigten in der Analyse der Duftstoffe verschiedene 2*H*-Pyranone mit unterschiedlich langen 6-Alkyl- bzw. -Alkenylseitenketten. Die Synthese der Referenzen, die ausgehend von Strukturüberlegungen erhaltener Massenspektren durchgeführt wurde, startete für die 6-Alkyl-2*H*-pyranone mit einer radikalischen Bromierung von δ -Lactonen und sofortiger Eliminierung von Bromwassertoff. Die 6-Alkenyl-2*H*-pyranone wurden über einen bereits publizierten STILLE Kupplungslactonisierungsansatz durchgeführt. Den optimalsten Syntheseansatz mit hohen Ausbeuten lieferte jedoch eine

gold-katalytische Kupplung von Propiolsäure mit terminalen Alkinen, entwickelt von SCHREIBER und Mitarbeitern. Weiterhin wurde die Maximalproduktion der 2*H*-Pyranone in Abhängigkeit von der Inkubationszeit getestet

Das Duftstoffprofil des endophytischen Pilzes *Geniculosporium* sp. lieferte nach Analyse des CLSA-Extraktes 2-Butyl-3-methylbut-2-enolid als Hauptkomponente, sowie die gesättigten Pendants *cis*-2-Butyl-3-methylbutanolid und *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolid. Die Synthese aller drei Verbindungen wurde in einem DIELS-ALDER/*retro*-DIELS-ALDER Ansatz, ausgehend von Citraconsäureanhydrid und Dicyclopentadien, durchgeführt. Die Reduktion des DIELS-ALDER-Produkts lieferte regioisomere Lactone, die nach α -Alkylierung und folgender *retro*-DIELS-ALDER-Reaktion das 2,3-disubstituierte Butenolid hervorbrachte. Abschließende Hydrierung und Isomerisierung ergab das gesättigte *cis*- und *trans*-Isomer. Aus einer bereits publizierten enantioselektiven DIELS-ALDER-Reaktion konnte die stereoselektive Synthese zu den Signalmolekülen aus *Streptomyces antibioticus* weiterentwickelt werden. Als Schlüsselschritt wurde enantiomeren angereichertes Lacton mit Aldehyden mit hoher Diastereoselektivität alkylirt.

Um den Biosyntheseweg zu den Gibberellinen aus *B. japonicum* USDA 110 aufzuklären, sollten die dafür verantwortlichen Gene der vermutlich beteiligten Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP112, CYP114, CYP117 sowie einer Ferredoxin Reduktase und des Ferredoxins coexprimiert werden. Es konnten für die drei Monooxygenasen Vektor-Insert-Konstrukte cloniert werden, die nach Induktion mit IPTG, δ -ALA und Fe^{2+} exprimiert wurden. Die Fusionsproteine Fer-pMal-c5X und CYP114-pMal-c5X wurden erfolgreich über Amyloseharz chromatographiert und mit der Proteinase Faktor Xa behandelt.

Schlagwörter:

Duftstoffe, Bakterien und Pilze, GC-MS, Synthese

Abstract

In the context of this thesis the volatile profiles of the bacterium *Corynebacterium glutamicum*, the fungi *Fusarium fujikuroi*, *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum* and *Geniculosporium* sp. 9910 were investigated by the use of the CLSA-technique or liquid extraction, and analysed by GC-MS.

The analysis of the volatile profile of *C. glutamicum* showed a pattern of several pyrazine and acyloin derivatives. These compounds were confirmed by comparison of synthesized or commercial available references. In collaboration with the Institute of Biochemical Engineering of the TU Braunschweig the biosynthesis of different pyrazine derivatives was investigated by feeding experiments of isotope labelled precursors or by the determination of volatile profiles of knockout mutants of the primary metabolism.

The fungus *Fusarium fujikuroi* exhibited after liquid extraction and following GC-MS analysis several pyridine derivatives. In comparison to available data bases fusaric acid could be identified. A new synthesis route to fusaric acid was developed starting from an iron catalysed cross-coupling reaction by FÜRSTNER and LEITNER of 2,5-dichloropyridine leading into two regioisomeric products. The following carbonylation gave fusaric acid methylester yielding into the desired product after saponification. The identified decarboxylation product 3-butylpyridine was also available by cross-coupling reaction of 3-chloropyridine. The confirmation of homoallylic pyridine remains tentative. Feeding experiments of [2-¹³C]acetate yielded into an incorporation rate of 5.8 % in 3-butylpyridine.

The soil borne fungi *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum* showed several alkyl- and alkenyl-2*H*-pyrone-2-ones after the analysis of the headspace-extracts. Based on structural suggestions of the obtained mass spectra the synthesis of the references for the alkyl-2*H*-pyrone-2-ones were carried out with a reported synthetic approach by radical bromination of 5-alkylpent-2-en-5-olides and dehydrobromination. All alkenyl pyrones were synthesised by using a reported STILLE coupling followed by lactonisation. A gold-catalysed coupling of terminal alkynes with propiolic acid, developed by SCHREIBER and co-workers, turned out to be the best method to synthesize alkyl- and alkenyl-2*H*-pyrone-2-ones giving

high yields in all cases. Furthermore, time course experiments were performed giving the maximal production of 2*H*-pyrone-2-ones as a function of the time of incubation.

The volatile profile of the CLSA-extract of the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. showed 2-Butyl-3-methylbut-2-enolide as main component, as well as the saturated counterpart *cis*-2-Butyl-3-methylbutanolide and *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolide. All of the three compounds were synthesised by using a DIELS-ALDER/*retro*-DIELS-ALDER approach starting from citraconic anhydride and dicyclopentadiene. The reduction of the DIELS-ALDER products led into regioisomeric lactones. Following α -alkylation and *retro*-DIELS-ALDER reaction gave the 2,3-disubstituted butenolide. The *cis*- and *trans*-isomeres were obtained after hydration and isomerisation. Furthermore, an already published enantioselective synthesis to two signal molecules from *Streptomyces antibioticus* was refined. As a keystone enantioenriched lactone was alkylated with aldehydes in high diastereoselectivity.

To elucidate the biosynthetic pathway of *B. japonicum* to the gibberellins, the supposedly participating genes encoding for a cytochrome P450 monooxygenase CYP112, CYP114, CYP117 as well as ferredoxin-reductase and a ferredoxin were coexpressed. Three monooxygenase vector-insert constructs were cloned and after induction with IPTG, δ -ALA, and Fe^{2+} expressed. The fusion proteins Fer-pMal-c5X and CYP114-pMal-c5X were chromatographed successfully, and were treated with the Proteinase Factor Xa.

Keywords:

volatiles, bacteria and fungi, GC-MS, synthesis

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen.....	III
Danksagung	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	X
I. Einleitung	1
1. Sekundärmetabolite als Naturstoffe	2
2. Bakterien und Pilze als Lieferanten für flüchtige Sekundärmetabolite	4
3. Extraktion flüchtiger Duftstoffe	5
II. Pyrazine aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	7
1. Das Bakterium <i>Corynebacterium glutamicum</i>	8
2. Pyrazine	9
2.1 Die MAILLARD Reaktion	11
2.2 Pyrazinsynthese	15
3. Ergebnisse und Diskussion	18
3.1 Pyrazine aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	18
3.1.1 Duftstoffe von <i>C. glutamicum</i>	18
3.1.2 Synthese der flüchtigen Duftstoffe aus <i>C. glutamicum</i>	26
4. Zusammenfassung Pyrazine aus <i>C. glutamicum</i>	28
III. <i>Fusarium fujikuroi</i> als Lieferant für flüchtige pyridinhaltige Verbindungen	30
1. Der Schimmelpilz <i>Fusarium fujikuroi</i>	31
2. Pyridine als Naturstoffe	32
2.1 Pyridinsynthese	34
3. Ergebnisse und Diskussion	36
3.1 Extraktanalyse.....	36
3.2 Synthese der Pyridinderivate	39
3.3 Biosynthese der Pyridinderivate	42
4. Zusammenfassung Pyridine aus <i>F. fujikuroi</i>	45
IV. α-Pyrone aus <i>Trichoderma</i>	46
1. <i>Trichoderma</i> sp.	47
2. α -Pyrone (2H-Pyran-2-one)	49
2.1 Synthese von α -Pyronen	51

2.2	Biosynthese von Pyronen.....	55
3.	Pyrone aus <i>Trichoderma asperellum</i> und <i>Trichoderma viride</i>	59
3.1	Flüchtige Duftstoffe aus <i>Trichoderma</i>	59
3.2	Flüchtige Duftstoffe von <i>T. viride</i>	60
3.3	Flüchtige Duftstoffe von <i>T. asperellum</i>	63
3.3.1	Synthese der 6-Alkyl-2 <i>H</i> -pyranone und 6-Alkenyl-2 <i>H</i> -pyranone	64
3.3.2	Synthese von Dimethoxystyrol	68
3.4	Zeitreihenexperimente	68
4.	Zusammenfassung Pyrone aus <i>T. asperellum</i> und <i>T. viride</i>	71
V.	Lactone aus <i>Geniculosporium</i> sp.....	73
1.	Der Endophyt <i>Geniculosporium</i> sp.....	74
2.	γ -Lactone in der Natur	75
2.1	Lactonsynthese.....	76
3.	Biosynthese von γ -Lactonen	77
4.	Flüchtige Duftstoffe aus <i>Geniculosporium</i> sp. 9910.....	79
4.1	Synthese flüchtiger Verbindungen aus <i>Geniculosporium</i>	81
4.2	Enantioselektive Synthese von Signalverbindungen.....	83
5.	Lactone aus <i>Geniculosporium</i> sp.	86
VI.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	87
1.	Das Rhizobakterium <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	88
2.	Die Biosynthese von Gibberellinen in Pflanzen und Pilzen.....	88
3.	Heterologe Expression der P450-Monooxygenasen und Ferredoxin aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110.....	92
3.1	Klonierungsstrategie	93
3.2	Das pMal-c5X Klonierungs- und Expressionssystem.....	94
3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	96
3.4	Restriktion, Ligation und Transformation in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	96
4.	Heterologe Expression	97
4.1	Heterologe Expression des Ferredoxins.....	97
4.2	Heterologe Expression der P450-Monooxygenasen CYP 112, CYP114 und CYP117	97
4.3	Chromatographie der Fusionsproteine Fer-pMal-c5X und CYP114-pMal-c5X.....	101
4.4	Abspaltung des Maltose-binding-Protein.....	103
5.	Die Monooxygenasen und Ferredoxin aus <i>B. japonicum</i>	104
VII.	Ausblick	106
VIII.	Experimenteller Teil.....	111
1.	Allgemeines	112

1.1	Chemikalien und Medienbestandteile	112
1.2	Lösemittel	112
1.3	Chromatographie	112
1.4	Spektroskopische Methoden	113
2.	Synthesen	114
2.1	Darstellung der Pyrazin-N-oxide ^[91]	114
2.2	Darstellung der Chloropyrazine ^[252]	116
2.3	Allgemeine Darstellung der Kreuz-Kupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER ^[87]	117
2.4	Darstellung der 1,3-Dithiane ^[253]	123
2.5	Darstellung der 2-Alkyl-2-(1-hydroxyalkyl)-1,3-dithiane ^[254]	126
2.6	Darstellung der Acyloine	129
2.7	Pyridine und Fusarinsäure.....	132
2.8	Darstellung der Homoallylakohole ^[255]	133
2.9	Darstellung der Homoallylacrylate ^[191]	135
2.10	Darstellung der 5,6-Dihydro-2 <i>H</i> -pyranone ^[256]	138
2.11	Darstellung der 6-Alkyl-2 <i>H</i> -pyrone.....	140
2.12	Darstellung von Butinsäure (238) ^[257]	142
2.13	Darstellung von Tributylstannyl 4-(tributylstannyl)but-3-enoat (197) ^[173]	143
2.14	Darstellung der Säurechloride.....	144
2.15	STILLE-Kupplung ^[173]	146
2.16	Darstellung von 6-Alkyl-2 <i>H</i> -pyronen und -pyronbromiden mittels Goldkatalyse ^[175]	148
2.17	Darstellung von Diethyl-((2-oxo-2 <i>H</i> -pyran-6-yl)-methyl)-phosphoniumbromid (251)	149
2.18	Die HORNER-WADSWORTH-EMMONS Reaktion zu 179 und 214.....	149
2.19	Die KNOEVENAGEL Kondensation ^[195] zu 2-Methoxy-4-vinylphenol (254).....	150
2.20	Darstellung von 3,4-Dimethoxystyrol (215) ^[258]	151
2.21	Die DIELS-ALDER-Reaktion	152
2.22	Reduktion.....	153
2.23	Die LEY-Oxidation	155
2.24	Alkylierungen	156
2.25	<i>retro</i> -DIELS-ALDER Reaktion.....	160
2.26	Palladium-katalysierte Hydrierung	162
2.27	Isomerisierungsreaktion	163
3.	Kultivierungsbedingungen der Pilzstämmen für CLSA-Analysen	165
3.1	Verwendete Pilzstämmen.....	165
3.2	Nährmedien.....	165
3.3	Kultivierung	166
3.4	Extraktion der Duftstoffe mittels CLSA und GC-MS-Analyse	167

3.5	Flüssigextraktion von <i>Fusarium fujikuroi</i>	167
3.5.1	Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern.....	167
4.	Herstellung rekombinanter Fusionsproteine aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110.....	168
4.1	Kultivierung von <i>B. japonicum</i> USDA 110	168
4.2	Isolierung genomischer DNA	168
4.3	Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	169
4.3.1	Antibiotika	169
4.4	pMal [™] -c5X Vektor	169
4.5	Plasmidisolierung.....	169
4.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	170
4.7	Analytik und Aufreinigung der DNA nach PCR	171
4.7.1	Agarosegelelektrophorese.....	171
4.7.2	Aufreinigung.....	171
4.8	Konzentrationsbestimmung	172
4.9	Klonierung	172
4.9.1	Restriktionsverdau	172
4.9.2	Dephosphorylierung	172
4.9.3	Ligation.....	172
4.10	Transformation von <i>E. coli</i>	173
4.10.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	173
4.10.2	Elektroporation	173
4.10.3	Kolonie-PCR	174
4.11	Expression rekombinanter Proteine	174
4.11.1	Expression des Ferredoxins	174
4.11.2	Expression der Monooxygenasen CYP112, CYP114 und CYP117	175
4.12	Proteinextraktion und Aufreinigung	175
4.12.1	Zellaufschluss	175
4.12.2	Affinitätschromatographie	175
4.12.3	Spaltung des Fusionsprotein	176
4.13	Analytik von Proteinen	176
4.13.1	SDS-Page.....	176
4.13.2	Bradford-Test.....	177
IX.	Literatur	178

I. Einleitung

1. Sekundärmetabolite als Naturstoffe

Der Begriff "Naturstoffe" beinhaltet im chemischen Sinne alle in der Natur vorkommenden Stoffe, die von einem lebenden Organismus gebildet wurden. Es handelt sich dabei um organische Verbindungen, die aus Pflanzen, Tieren sowie Mikroorganismen isoliert werden können. Während auf der Rechtsebene ein Naturstoff im Art. 3, Ziffer 39, VO (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) als „natürlich vorkommender Stoff, der unverarbeitet durch verschiedene Extraktionsmöglichkeiten gewonnen wurde“, klassifiziert wird^[1], werden im Allgemeinen auch totalsynthetisch gewonnene Substanzen als Naturstoffe betrachtet.

Alle Stoffwechselprodukte, die ein Organismus nicht zum Überleben benötigt werden als Sekundärmetabolite bezeichnet und von Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen produziert. Die sekundär gebildeten Stoffe sind oft typisch für eine Gattung und dienen dem Lebewesen dabei z.B. als Pheromon, Abwehrstoff, Antibiotikum, Duftstoff oder auch Farbstoff. Das Portfolio dieser Naturstoffe findet Einteilungen z.B. nach Vorkommen (Pilze, Bakterien, Pflanzen) nach Funktion und Wirkung (Geschmacksstoff, Antibiotikum, Pheromon) chemischer Struktur (Anthocyane, Alkaloide, Carotinoide) oder nach deren Biosynthese (Polyketide aus Acetateinheiten, Alkaloide aus Aminosäuren, Terpene und Steroide aus Isopreneinheiten). Neben der eigentlichen Funktion des Sekundärmetabolits für den jeweiligen Organismus hat auch der Mensch schon seit Jahrtausenden seinen eigenen Nutzen aus diesen Stoffen gezogen.

Die berauschende Wirkung von Kokain (**1**) (Abbildung 1) wurde bereits im Inka-Reich (um 1200 n. Chr.) durch den Verzehr von Kokablättern in Kombination mit Alkohol induziert.^[2] Hingegen wurde Chinin (**2**) aus der Rinde des Chinarindenbaums *Cinchona pubescens* erfolgreich von dem Mönch Calancha in Peru um 1633 n. Chr. als Arzneistoff gegen Malaria eingesetzt.^[3] Im Bereich der medizinischen Therapie haben Naturstoffe bis heute eine breite Anwendung gefunden. Die Isolierung von Morphin (**3**) aus Schlafmohn (*Papaver somniferum*) im Jahre 1803 gelang dem Apotheker Friedrich Wilhelm von Sertürner^[4], das heute zur Behandlung von starken und stärksten Schmerzen Einsatz findet. Mit der Entdeckung des Penicillins (**4**) aus *Penicillium notatum* und dessen antibiotische Wirkung durch Sir Alexander Fleming^[5] begann die Ära der Antibiotika. Die mitunter bekanntesten antibiotisch wirkenden Substanzen haben ihren Ursprung als Metabolite aus Bakterien, wie

z. B. Erythromycin (**5**) aus *Saccharopolyspora erythraea*^[6], Vancomycin (**6**) aus *Amycolatopsis orientalis*^[7] oder Tetracyclin (**7**) aus *Streptomyces aureofaciens*^[8].

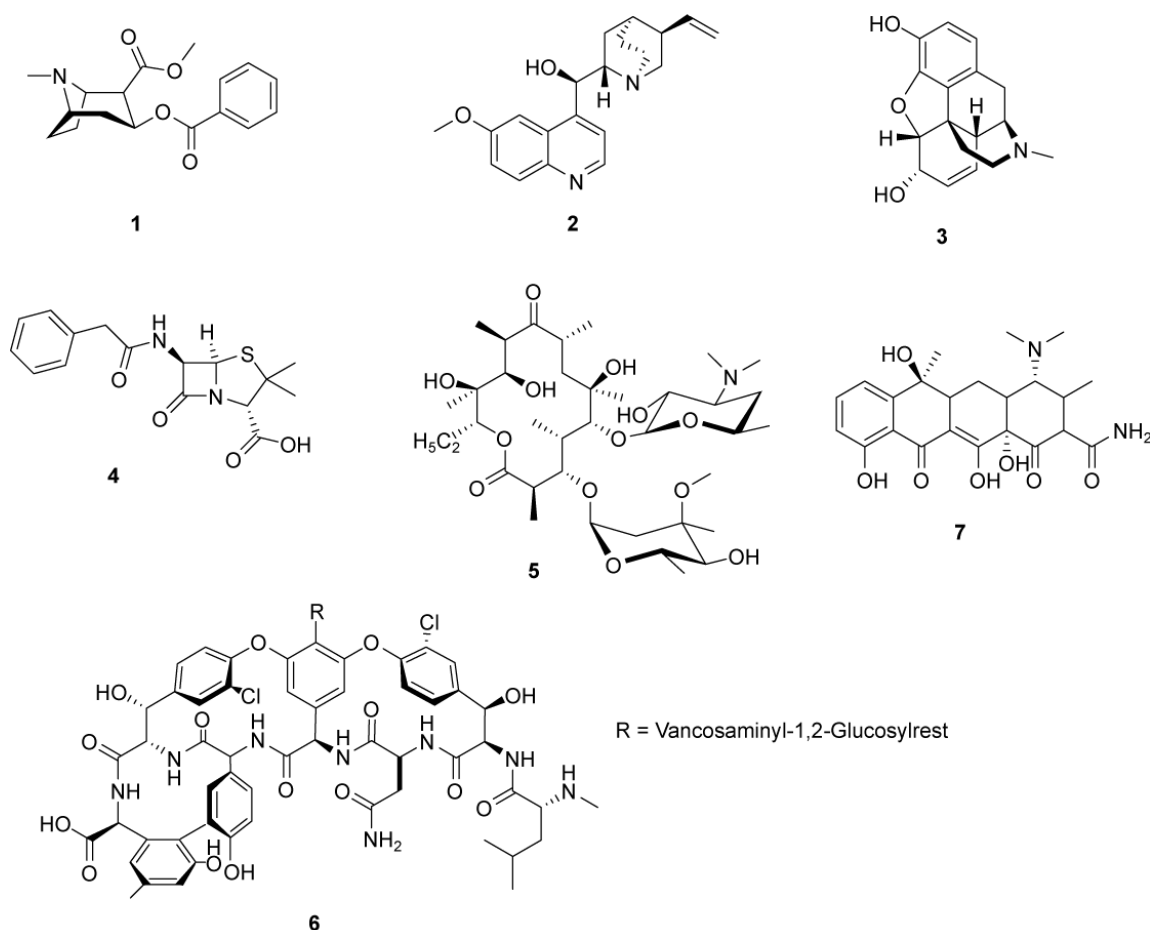


Abbildung 1: Naturstoffe aus Pflanzen und Mikroorganismen.

Neben dem therapeutischen Nutzen finden Naturstoffe, die ursprünglich als Sekundärmetabolite aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen charakterisiert wurden, heutzutage eine breite Anwendungspalette. Der Einsatz reicht dabei von der Aromatisierung von Lebensmitteln und kosmetischen Mitteln über die Konservierung bis hin zu wachstumsregulatorischen Zwecken in der Landwirtschaft und im Obst- und Zierpflanzenanbau. Um z. B. den Ertrag zu steigern werden sowohl natürliche als auch synthetische Analoga von Phytohormonen wie Auxinen, Gibberellinen, Cytokinen,

Abscinsäure oder auch Ethylen zur Beeinflussung der Fruchtgröße, Standfestigkeit von Pflanzen sowie Reifungsprozessen von Früchten verwendet.^[9]

2. Bakterien und Pilze als Lieferanten für flüchtige Sekundärmetabolite

Im alltäglichen Leben begegnet man den unterschiedlichsten Geruchseindrücken, die ihren Ursprung als Produkte von Mikroorganismen haben. Dabei werden diese als wohlriechend oder arteigen akzeptiert wie z. B. der Geruch des Roquefort Käse induziert von *Penicillium roqueforti*. Andererseits findet der durch Bakterien produzierte menschliche Schweißgeruch keine hohe Akzeptanz und wird durch die Anwendung von Deodorants überdeckt. Vollständig abgelehnt sogar, werden muffig, fischig modrig oder erdig riechende Lebensmittel.

Die Herkunft der Mikroorganismen und die bisher identifizierten Substanzklassen sind dabei weitreichend. Der typische Geruch nach Champignon wird durch 1-Octen-3-ol (**8**) (Abbildung 2) hervorgerufen, das als Abbauprodukt von Linolensäure unter anderem aus dem Pilz *Psalliota bispora* hervorgeht.^[10] Das C13-Norisoprenoid β -Jonon (**9**) konnte aus Cyanobakterien der Gattung *Phormidium* sp. nachgewiesen werden und ist ein Abbauprodukt des C40-Isoprenoid β -Carotin. Der Geruch frisch umgegrabener Erde wird dem Sesquiterpen Geosmin (**10**) zugeschrieben, das als Produkt von Streptomyceten^[11], *Myxococcus xanthus*^[12] oder auch Cyanobakterien^[13] identifiziert wurde. Neben vielen Bakterien^[14] konnte das nach Rosen riechende, aromatische 2-Phenylethanol (**11**) auch aus *Aspergillus niger* nachgewiesen werden.^[15]

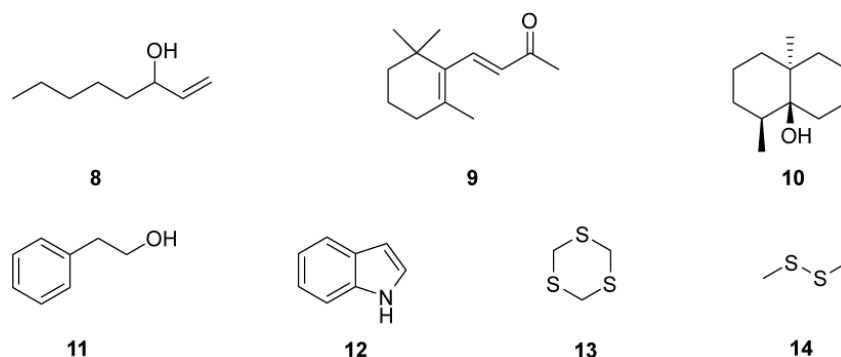


Abbildung 2: Flüchtige Duftstoffe von Bakterien und Pilzen.

Der von Tryptophan abgeleitete Heterozyklus Indol (**12**) wird u. a. von vielen *Enterobacter*-Stämmen^[16] produziert und ist der Hauptduftstoff von *Escherichia*^[17]. Schwefelhaltige Heterozyklen wie 1,2,4-Trithiolan (**13**) konnten im Aromaprofil des Shitake-Pilzes *Lentinus edodes* Sing identifiziert werden, die für den charakteristischen Geruch der getrockneten Pilze verantwortlich sind.^[18] Aus marinen Bakterien der Nordsee aus der *Roseobacter* Gruppe konnte u. a. der Schwefelmetabolit Dimethyldisulfid (**14**) nachgewiesen werden, das als Spaltprodukt von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) hervorgeht.^[19]

3. Extraktion flüchtiger Duftstoffe

Die Extraktion von Duftstoffen und Aromastoffen kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden. Die simultane Destillation Extraktion (SDE) nach LIKENS und NICKERSON gewährleistet die Überführung von Duftstoffen aus einem wässrigen Medium in ein leicht zu entfernendes Lösemittel.^[20] Eine weitaus schonendere Methode flüchtige Duftstoffe zu erhalten bietet die SAFE-Technik (solvent assistet flavor evaporation), die durch das Anlegen eines Hochvakuums eine Artefaktbildung aufgrund zu hoher Temperatur vermeidet.^[21] Beide Methoden setzen jedoch ein großes Probenvolumen voraus, dass im Falle der Extraktion der Duftstoffe von Agarplatten einer Bakterien- oder Pilzkultur nicht gegeben ist.

Hier bieten sich zwei nicht invasive Praktiken an, die für die Analysen im Spurenbereich geeigneter sind. Das Verfahren der Festphasenmikroextraktion (SPME, solid phase micro extraction) bietet eine schnelle und einfache Technik, die ohne Lösemittel auskommt und die Arbeitsschritte Probenvorbereitung, Extraktion und Konzentration kombiniert. Bei diesem Prinzip adsorbiert der Analyt, aus dem wässrigen Medium oder Gasraum, auf eine Polymer (häufig PDMS, Polydimethylsiloxan) beschichtete Glasfaser. Zum Schutz des Analyten ist diese Glasfaser in einer modifizierten Spritze untergebracht. In Abhängigkeit des Analyseverfahrens erfolgt die Desorption des Analyten thermisch im Injektor eines Gaschromatographen (GC) oder durch einen Eluenten im Einspritzsystem einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie Anlage (HPLC, high-performance-liquid-chromatography).^[22] Auf diese Weise wurden bereits Analysen aus Wasser^[23], Pflanzen^[24], Bakterien^[25,26] und Pilzen^[27] durchgeführt. Ein Nachteil der SPME-Technik ist der vollständige Verbrauch der Analyten nach bereits einer einzigen Messung.

Im Gegensatz dazu gewährleistet die CLSA-Technik (closed-loop-stripping-analysis) einige Mikroliter einer Lösung der Analyten zu erhalten und bietet somit die Möglichkeit wiederholter GC-MS Messungen einer einzigen Probe, um evtl. Derivatisierungen oder Messungen auf chiralen stationären Phasen durchzuführen.^[28] Das Prinzip beruht auf einem geschlossenen System, durch das ein kontinuierlicher Luftstrom mittels einer Pumpe über die Probe in einer Kammer geleitet wird. Die abgegebenen Duftstoffe werden auf einen zwischengeschalteten Aktivkohlefilter adsorbiert, der anschließend mittels eines geringen Volumens Lösemittel vom Aktivkohlefilter desorbiert werden und schließlich zur Analyse zur Verfügung stehen (vgl. Abbildung 3). Ursprünglich wurde die Methode zur Untersuchung von Wasser entwickelt^[29], bietet heute in modifizierter Form neben der Anfertigung eines Duftstoffprofils von Bakterien^[30–34] und Pilzkulturen^[35–38], auch Pheromonprofile von lebenden Insekten^[39,40].

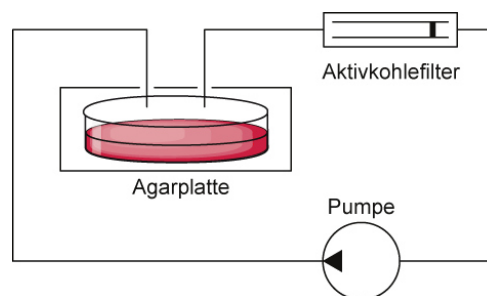


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer CLSA-Apparatur.

II. Pyrazine aus *Corynebacterium glutamicum*

1. Das Bakterium *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum (Abbildung 4) wurde erstmals 1957 von KINOSHITA in Bodenproben in einem Screening nach Glutaminsäureproduzenten entdeckt.^[41] Es zeichnet sich durch eine Keulenform (*koryne*: Keule, griech.) aus, ist gram-positiv, aerob lebend und nicht pathogen. Phylogenetisch wurde *C. glutamicum* in die Familie der mykolsäurehaltigen Actinomyceten, Unterordnung *Corynebacterineae* eingeteilt.^[42] Heute ist der natürliche Glutamatproduzent industriell von sehr großem Interesse. Die Einstufung als GRAS-Organismus (*generally recognized as safe*) macht *C. glutamicum* als biotechnologisch bedeutsamen Produzenten in der Lebensmittelindustrie für die fermentative Herstellung des Geschmacksverstärkers L-Glutamat (**15**), sowie L-Lysin (**16**), das als Futtermittelzusatzstoff Anwendung findet. Weiterhin werden die verzweigten Aminoäuren Valin (**17**), Isoleucin (**18**) und Leucin (**19**) durch genetische Modifikation von *C. glutamicum* zugänglich gemacht.^[43]

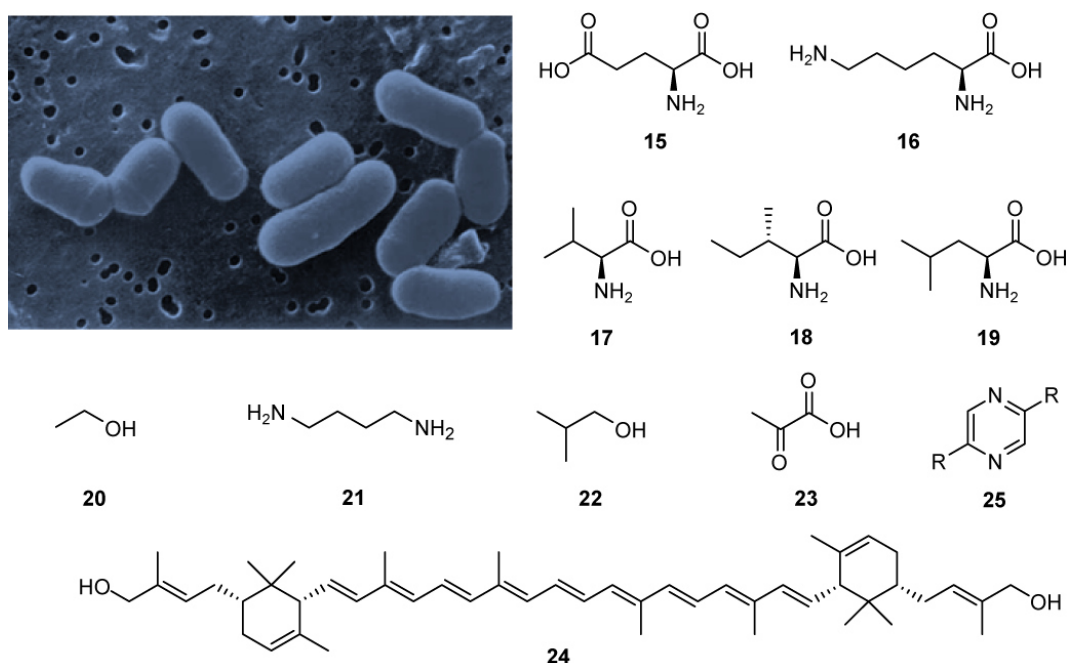


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *C. glutamicum*; Quelle: IBG-1, Forschungszentrum Jülich; Primär- und Sekundärmetabolite synthetisiert von *C. glutamicum*.

Ferner sind die fermentativ gewonnenen biobasierten Chemikalien Ethanol (**20**)^[44,45], Putrescin (**21**)^[46], sowie Isobutanol (**22**)^[47] und Pyruvat (**23**)^[48] für die Industrie attraktiv. Neben der Produktion von Primärmetaboliten, konnte die Synthese verschiedener

Sekundärmetabolite ausgehend von *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Darunter zählen u. a. das C50-Carotenoid Decaprenoxanthin (**24**)^[49] und verschiedene Pyrazine (**25**).^[34,50]

2. Pyrazine

Pyrazine (1,4-Diazine) sind weit verbreitet in der Natur. Strukturell allen gemeinsam ist ein aromatischer Ring mit zwei Stickstoffatomen mit Anordnung in *para* Position. Abgeleitet von diesem Grundgerüst treten viele verschiedene Isomere auf, die sich hinsichtlich des Substitutionsmusters, sowie weiterer Funktionalitäten unterscheiden.^[14] Pyrazine sind von großer Bedeutung in Lebensmitteln, als Biosyntheseprodukte von pflanzlichen oder tierischen Organismen, sowie Mikroorganismen. Dabei reichen die Geruchseindrücke von erdig, nussig, paprikaartig über süß zu erbsenartig.^[51] Als bakterielle Sekundärmetabolite sind unterschiedlich substituierte Pyrazine anzutreffen (Abbildung 5). Zahlreich sind mono-, di-, tri- oder tetramethylsubstituierte Pyrazine. Es konnten Methylpyrazin (**26**), die disubstituierten Regioisomere 2,5-Dimethylpyrazin (**27**), 2,3-Dimethylpyrazin (**28**) sowie 2,6-Dimethylpyrazin (**29**) aus Bakterien isoliert werden.^[31] Ferner wurden tri- und tetrasubstituierte Alkylpyrazine bakteriell gebildet, wobei vorwiegend Vertreter mit höchstens einer Ethylsubstitution wie z. B. 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (**30**), 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin (**31**), sowie Trimethylpyrazin (**32**) oder Tetramethylpyrazin (**33**) nachweisbar waren. Die Untersuchungen erfolgten an Organismen terrestrischer, mariner oder rhizosphärischer Herkunft.^[16,52–55]

Im Medium von *Paenibacillus polymyxa* konnten die isopropylsubstituierten Pyrazine 2-Isopropylpyrazin (**34**), 2-Methyl-5-isopropylpyrazin (**35**), 2,5-Diisopropylpyrazin (**36**), 2-Isopropyl-5-isobutylpyrazin (**37**), sowie 2-Isopropyl-5-*sec*-butylpyrazin (**38**) nachgewiesen werden.^[56] Gasraumanalysen des Myxobacteriums *Chondromyces crocatus* zeigte ebenfalls die bakterielle Synthese der Verbindung **36** und zudem der disubstituierten Pyrazine 2-(Prop-1-en-1-yl)-5-isopropylpyrazin (**39**) sowie 2-(Prop-1-en-1-yl)-6-isopropylpyrazin (**40**).^[57] Weiterhin wurden aus *C. crocatus* die methylsubstituierten Methoxypyrazine 2,5-Diisopropyl-3-methoxypyrazin (**41**), 2-Isopropyl-5-isobutyl-3-methoxypyrazin (**42**) und 2-Isopropyl-5-*sec*-butyl-3-methoxypyrazin (**43**) identifiziert.^[31] *Pseudomonas taetrolens* setzt ebenfalls Methoxypyrazine frei.^[58] Strukturell sind diese Methoxypyrazine einfacher gestaltet und besitzen nur eine Alkylsubstitution zu der Methoxyfunktion. Nachgewiesen werden

konnten 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin (**44**), 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin (**45**) und 3-*sec*-Butyl-2-methoxypyrazin (**46**), die bereits in hohen Gehalten aus Gemüse wie Spargel, rohen Kartoffeln und Paprika bekannt waren.^[59] In Rebsorten wie Cabernet Sauvignon und Sauvignon Blanc tragen die Methoxypyrazine **41-43** zum typischen Aroma bei.^[60]

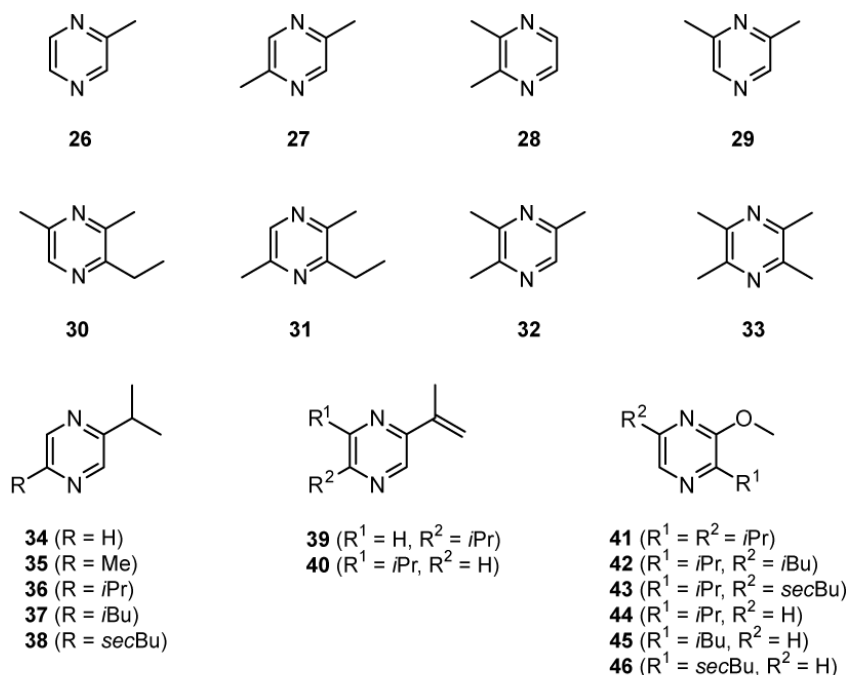


Abbildung 5: Pyrazine als Sekundärmetabolite.

Die vielfältige Wirkung von Pyrazinen spiegelt sich auch im Pflanzen-, Tier- und Insektenreich wider, wo Pyrazine als pheromonale Alarmsignale zur Abschreckung oder auch zur Rekrutierung dienen.^[61–64] Im Abwehrsekret von *Coccinellidae* (Marienkäfern) z.B. und anderen aposematischen Insekten sind die Verbindungen **41** und **42** enthalten.^[65] Eine symbiontische Beziehung lässt sich zwischen dem als Plage auftretenden Käfer *Carpophilus humeralis* und Bakterien, die auf verrottenden Früchten wachsen, ableiten. Das von den Bakterien produzierte Pyrazin **36** dient in diesem Fall als Lockstoff für den Käfer.^[66] Alkylpyrazine wie **31** sind als pheromonale Alarmbotenstoffe in Ameisen bekannt.^[67]

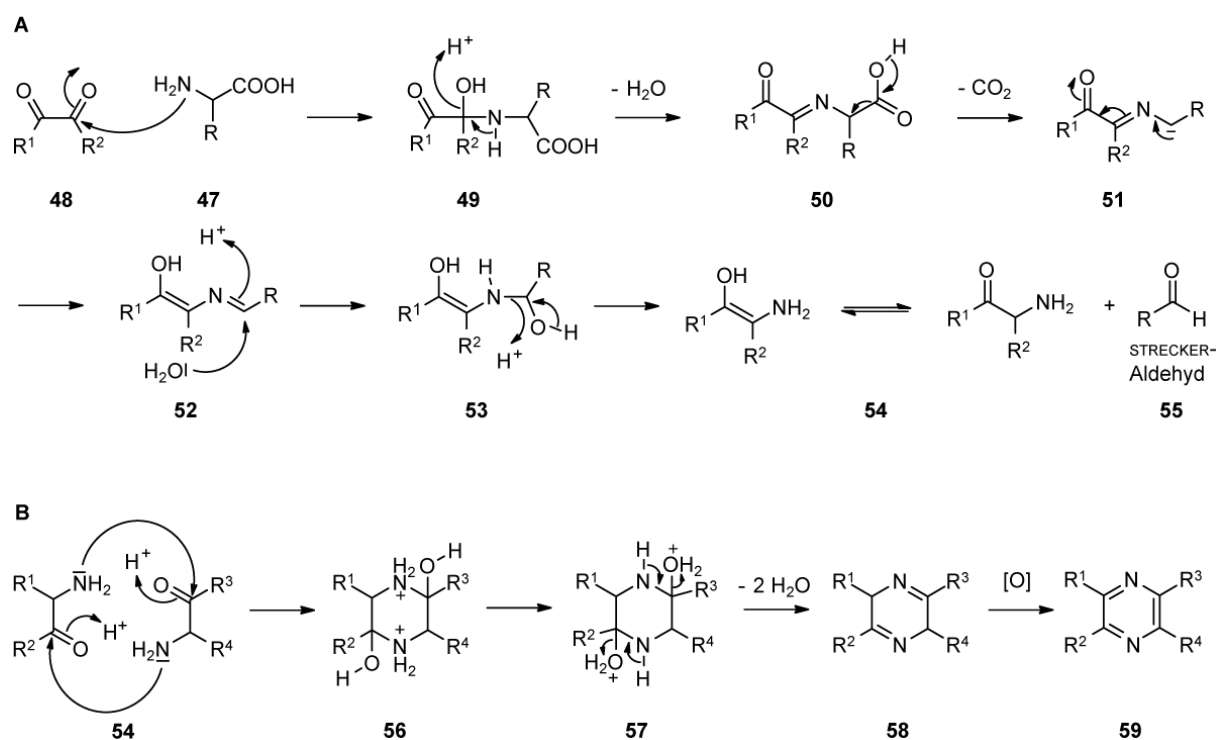
Neben den auf biosynthetisch hergestellten Wegen können Pyrazine auch auf chemischem Weg gebildet werden. Weitaus häufiger anzutreffen sind Pyrazine demnach in erhitzten Lebensmitteln.

2.1 Die MAILLARD Reaktion

Die thermische Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern ist unter der MAILLARD Reaktion oder der nichtenzymatischen Bräunung bekannt. Im Verlauf dieser Reaktion werden unterschiedliche Produkte gebildet, die einerseits durch Aromabildung erwünscht sein können, wie bei Back- und Bratprozessen^[68] oder auch unerwünscht wie die Bildung von Röstbitterstoffen bei gegrilltem Fleisch oder Fisch. Das trialkylierte Pyrazin 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (**30**) z. B. ist eines der wichtigsten Röstaromastoffe von gegrilltem Fleisch und liefert einen fleischigen, angebratenen wohlriechenden Geruchseindruck.^[69–71] Geröstete Erdnüsse liefern ein ganzes Bouquet an Pyrazinen, u. a. die disubstituierten nussig riechenden Verbindungen **27**, **28**, **43**, sowie Methylpyrazin (**26**).^[72] Weitere Lieferanten von Pyrazinen, die aus der MAILLARD Reaktion resultieren sind Kaffee, Schokolade und Kartoffelchips.^[73–76] Die Dauer des Röstprozesses hat einen direkten Einfluss auf das Vorliegen eines vorwiegend gebildeten Pyrazins. Es konnte festgestellt werden, dass in hellem Schwarznesselöl **27** quantitativ am meisten vertreten war, wohingegen in dunkel geröstetem Schwarznesselöl der größte Anteil an Pyrazinen auf **26**, mit 38.5 % bezogen auf die Gesamtmenge enthaltener Pyrazine, entfiel.^[77]

Die MAILLARD Reaktion wird nach HODGES in drei Abschnitte unterteilt dessen Endprodukte zu AMADORI-Verbindungen (1-Amino-1-desoxyketosen) und HEYNS-Verbindungen (2-Amino-2-desoxyaldosen) führen. Die Weiterreaktion von AMADORI-Verbindungen liefert 2-, 3- und 4-Desoxyosone als α -Dicarbonylverbindungen.

Für die Bildung von Pyrazinen ist der im Weiteren beschriebene STRECKER Abbau als Folgereaktion der MAILLARD Reaktion von großer Bedeutung. Während der STRECKER Reaktion (Schema 1A) wird eine α -Aminosäure initiiert von einer α -Dicarbonylverbindung abgebaut und es bilden sich unter oxidativer Decarboxylierung ein Aldehyd (STRECKER-Aldehyd), ein α -Aminoketon und CO₂.



Schema 1: STRECKER-Abbau von α -Dicarbonylverbindungen (A) und Kondensationsreaktion zu Pyrazinen als Produkte (B).

Dabei erfolgt im ersten Schritt eine nucleophile Addition der Aminogruppe der Aminosäure **47** an eine Carbonylgruppe der α -Dicarbonylverbindung (**48**). Nach Eliminierung von Wasser über die Zwischenstufe **49** wird das Imin (**50**) (eine Schiff'sche Base) ausgebildet. Im Anschluss erfolgt Decarboxylierung über **51** zu dem Alkohol **52**. Ein nucleophiler Angriff von Wasser liefert **53**, das nach Protonierung des Amids in dem α -Aminoenol **54** und dem STRECKER-Aldehyd **55** resultiert. Unter Keto-Enol-Tautomerie wird das α -Aminoketon ausgebildet.^[20,78,79] In einer Folgereaktion liefert die Kondensationsreaktion zwischen zwei α -Aminoketonen unter Wasserabspaltung über die Zwischenstufen **56** und **57** das Dihydropyrazin (**58**) (Schema 1B). Unter spontaner Oxidation wird letztlich das Pyrazin **59** gebildet.^[78]

In aktuelleren Untersuchungen von Guerra und Yaylayan^[80] wurden neue mechanistische Einblicke hinsichtlich der Bildung von Pyrazinen erhalten. Dafür wurden Pyrolysereaktionen mit den Isotopen markierten Vorläufern [1-¹³C]- und [2-¹³C]-Glycin (**61**) sowie ¹⁵N-Glycin mit 2,3-Butandion (**60**) durchgeführt. Die Produkte der Pyrolysereaktion waren neben dem

bereits vermuteten Tetramethylpyrazin (**33**), die di- und trisubstituierten Pyrazine 2,3-Dimethylpyrazin (**28**) sowie 2,3,5-Trimethylpyrazin (**32**).

Die Analyse der isotypenmarkierten Moleküle erfolgte über GC-MS. In allen identifizierten Pyrazinen konnte der Einbau von ^{15}N -Glycin festgestellt werden. Hingegen konnte in keinem identifizierten Pyrazin eine ^{13}C -Markierung nachgewiesen werden, dessen Ursprung auf $[1-^{13}\text{C}]$ -Glycin zurückzuführen wäre.

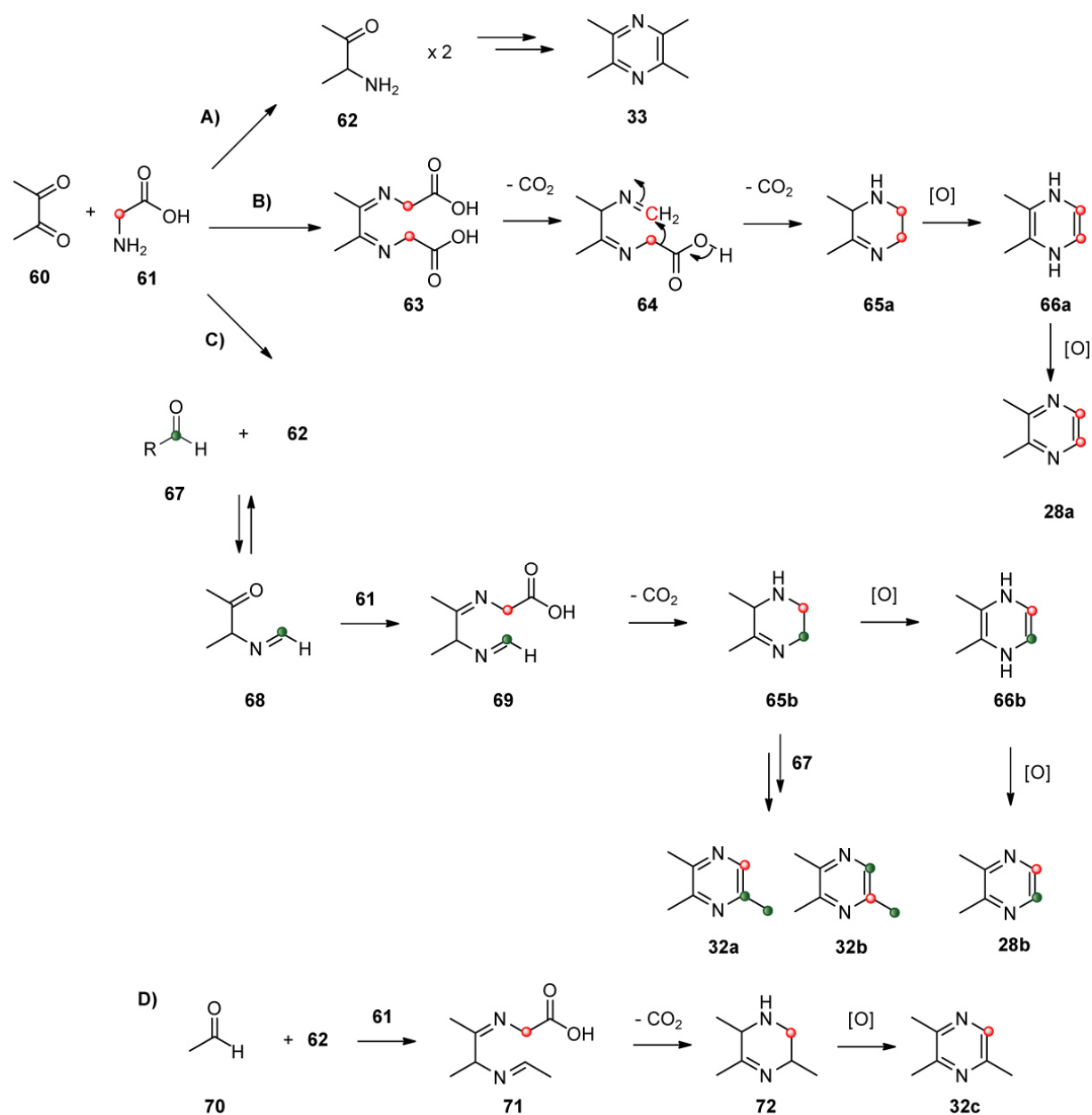
Die Bildung von **33** liefert Mechanismus A) in Schema 2. Dabei handelt es sich um eine STRECKER-Reaktion von Glycin und **60**. Infolgedessen wird 2-Amino-3-butanon (**62**) gebildet. und die Folgekondensation zweier Moleküle **62** liefert das unmarkierte Pyrazin **33**.

Des Weiteren wurden die Isotomere **28a** und **28b** nachgewiesen, die eine ^{13}C -Markierung der Kohlenstoffatome C-5 und C-6 tragen. Außerdem wurden die Isotomere **32a** und **32b** mit einer dreifachen ^{13}C -Markierung sowie **32c** mit einer einfachen Markierung in Position C-6 identifiziert. Anhand der Fragmentierungsmuster der Massenspektren sowie der identifizierten Produkte wurden drei neue Mechanismen zur Bildung von Pyrazinen vorgeschlagen.

Die Ausbildung von **28a** wird über einen Doppel-Schiff-Base Mechanismus erklärt (Schema 2B). Die Reaktion zweier Moleküle $[2-^{13}\text{C}]\text{-61}$ mit **60** führt zu dem Intermediat **63**, das nach Decarboxylierung das Imin **64** ausbildet. Eine weitere Decarboxylierung und anschließender intermolekularer nucleophiler Angriff bildet den Ring **65a** aus. Spontane Oxidation über das Dehydroaddukt **66a** liefert **28a** als doppelt markiertes Produkt an den Positionen C-5 und C-6.

Durch Weg B) kann jedoch die Bildung von dreifach markiertem Trimethylpyrazin über einen Doppel-Schiff-Base-Mechanismus in dem Modell-System Glycin : Butandion nicht erklärt werden. Demnach wurde eine weitere Möglichkeit zur pyrolytischen Pyrazinbildung vorgeschlagen (Schema 2C). Die Reaktion von **62** mit Formaldehyd (**67**) als Produkt des STRECKER-Abbaus von $[2-^{13}\text{C}]\text{-61}$ liefert das einfach ^{13}C -markierte Imin **68**. Ein nucleophiler Angriff von $[2-^{13}\text{C}]\text{-61}$ bildet **69** aus, das nach Decarboxylierung und Zyklisierung **65b** liefert. Nach Oxidation über **66b** werden durch erneute Reaktion mit **67** die dreifach ^{13}C -markierten Isotomere **32a** und **32b** erhalten. Ohne weiteren Einfluss eines Aldehyds wird **28b** auf gleichem Wege gebildet.

Das einfach markierte Trimethylpyrazin-Isotopomer wird über den Mechanismus D) in Schema 2 vermutet. Dabei wird davon ausgegangen, dass Acetaldehyd (**70**) als thermisches Abbauprodukt des unmarkierten Dion **60** in die Reaktion eingreift. Auf diesem Weg würde die Trimethylpyrazinbildung nach dem gleichen Mechanismus wie in C) beschrieben verlaufen und das einfach markierte Isotopomer **32c** ausbilden.^[80]



Schema 2: Untersuchung zum mechanistischen Verlauf zur Bildung von Pyrazinen. Rot markierte Kohlenstoffatome entsprechen der $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Markierung des eingesetzten Edukts von Glycin. Grün markierte Kohlenstoffatome geben die ^{13}C -Markierung des STRECKER-Aldehyds aus $2\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem Glycin wieder.

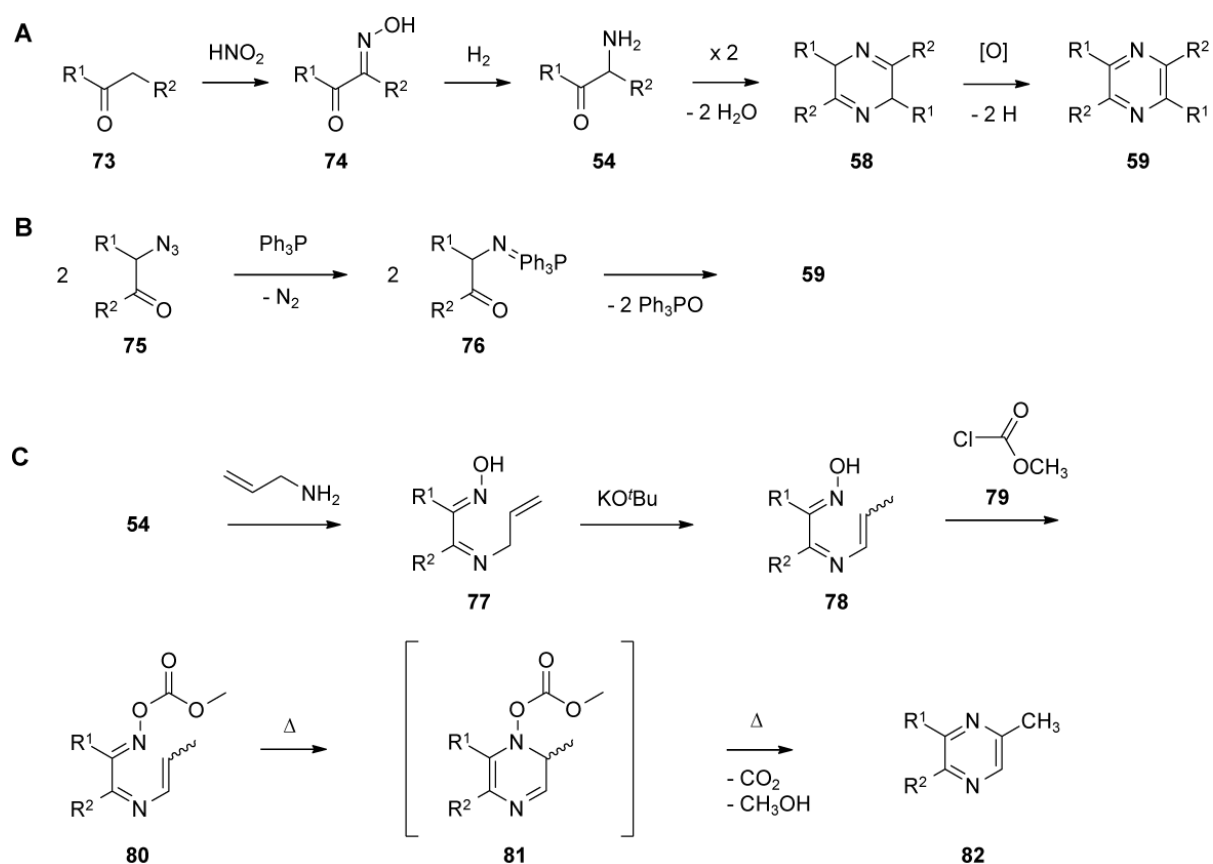
2.2 Pyrazinsynthese

Die bekannteste Synthese von Pyrazinen wurde von GUTKNECHT im Jahr 1880 entdeckt (Schema 3A). Der erste Schritt dieser klassischen Synthese ist die Bildung des Oximketons **74** durch Reaktion des Ketons **73** mit salpetriger Säure. Die Reduktion von **74** führt zum Aminoketon **54**. Kondensation zweier Moleküle **54** führt zum Dehydropyrazin **58**, das unter Oxidation das aromatische System des Pyrazins **59** ausbildet.^[81–84]

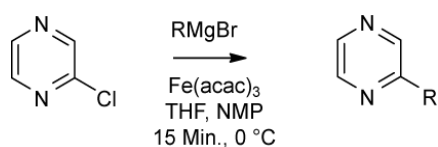
Eine weitere Methode zur Synthese von Pyrazinen bietet die Reaktion von α -Azidoketonen (**75**) mit Triphenylphosphin zu *P-N*-Yliden **76**. In einer Aza-WITTIG-Reaktion kondensieren diese zu den Pyrazinen des Typs **59** (Schema 3B)^[85] und wurde bereits zur Synthese von dialkylsubstituierten Pyrazinen und Methoxypyrazinen erfolgreich in einer Sequenz angewendet.^[31]

Im Jahr 1991 veröffentlichten BÜCHI et al. eine regioselektive Synthese zu alkylsubstituierten Pyrazinen (Schema 3C). Dabei wurde zuerst **74** mit Allylamin zu dem Imin **77** kondensiert. Eine Isomerisierung mit KO*t*Bu (Kalium-*tert*-butanolat) lieferte das 2-Aza-1,3-butadien (**78**), dass mit Methylchlorformiat (**79**) zu Verbindung **80** acyliert wurde. Kurze Pyrolysen von **80** ergaben über die nicht isolierbare Zwischenstufe **81** die Pyrazine **82** als Produkte.^[86]

An der Entwicklung der Kupplungsreaktion zwischen Alkylmagnesiumverbindungen und Arylchloriden waren FÜRSTNER et al. maßgeblich beteiligt, die die im Verlauf der Jahre immer interessanter gewordenen, preiswerten Eisensalze als Katalysatoren für Kupplungsreaktionen einsetzten. Es stellte sich heraus, dass katalytische Mengen von Eisen(III)-acetylacetonat (Fe(acac)₃) für Kupplungsreaktionen von primären Alkylmagnesiumverbindungen geeignet sind und u. a. erstmals zur Alkylierung von Chloropyrazinen Einsatz gefunden haben.^[87,88] Die kommerzielle Verfügbarkeit von Pyrazinylchloriden sowie deren einfache Synthese (vgl. Abschnitt 3.1.2) macht damit Alkylpyrazine über Kreuzkupplung einfach und schnell zugänglich (Schema 4) wie bereits DICKSCHAT et al. erfolgreich zeigen konnten.^[31]

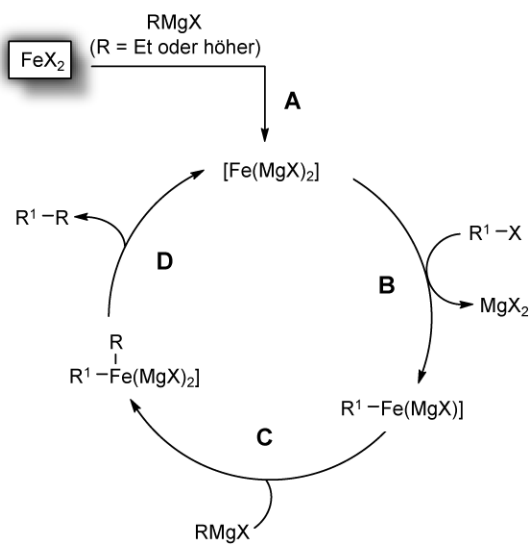


Schema 3: Syntheserouten zu Pyrazinen als Endprodukte.



Schema 4: Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER.

Die Aktivität des Eisensalzes wird dabei nach Reduktion des Katalysators von Fe(II)- oder Fe(III) zu Fe(0) mit der Grignardverbindung *in situ* gebildet (Schema 5A). Anschließend erfolgt oxidative Addition des Arylhalogenids in den aktiven Fe(0)-Komplex (Schema 5B), gefolgt von der Koordinierung der Grignardverbindung an den Fe-Aryl-Komplex. (Schema 5C). Im letzten Schritt wird schließlich das Produkt durch reduktive Kupplung der organischen Liganden aus dem Zyklus entlassen und der Katalysator regeneriert (Schema 5D).^[89,90]



Schema 5: Katalysezyklus der Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Pyrazine aus *Corynebacterium glutamicum*

3.1.1 Duftstoffe von *C. glutamicum*

Der Wildtyp von *C. glutamicum* wurde auf die Produktion flüchtiger Duftstoffe mittels der CLSA-Methode untersucht.^[34] Die identifizierten Verbindungen der GC-MS Analyse des Headspace-Extrakts des Wildtyps aus drei einzelnen Experimenten sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Identität der analysierten Verbindungen (Abbildung 6) wurde durch Synthese der vermuteten Substanz oder eines kommerziell erhältlichen Standard durch Vergleich der Retentionsindices und Massenspektren bestätigt. Ein exemplarisches Totalionenchromatogramm ist in Abbildung 9A wiedergegeben.

C. glutamicum (WT) erzeugt kontinuierlich vorwiegend Trimethylpyrazin (**32**), begleitet von Tetramethylpyrazin (**33**) und 2,3-Dimethylpyrazin (**28**) sowie 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin (**31**). Weiterhin konnten Methylpyrazin (**26**), 2,5-Dimethylpyrazin (**27**), 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (**30**), Ethyltrimethylpyrazin (**92**) und 2-Propyl-3,5-dimethylpyrazin (**91**) aus jeweils einem oder zwei Duftstoffextrakten identifiziert werden. Neben der Vielzahl an unterschiedlichen Pyrazinen bringt der Wildtyp die Acyloine 2-Hydroxyhexan-3-on (**87**) und Acetoin (**84**) überwiegend hervor. Ferner wurden 3-Hydroxypentan-2-on (**85**) und 2-Hydroxypentan-3-on (**86**) nachgewiesen.

DEMAIN et al. zeigte bereits an einer Mutante von *C. glutamicum*, dessen Mutation in einer Blockierung zur Biosynthese von Isoleucin / Valin bestand, dass eine Akkumulation von **84** zu einer erhöhten Bereitstellung von **33** führt.^[50] Der Nachweis von **33** wurde dabei durch Abfiltrieren der gewachsenen Kristalle im Kulturmedium durchgeführt.^[50] Weitere flüchtige Verbindungen oder Substanzen, die nicht in großen Mengen von dem Bakterium produziert wurden, sind mit dieser Methode nicht erfasst worden. Die CLSA-Methode mit anschließender GC-MS Analyse bietet hingegen die Möglichkeit auch geringe Mengen flüchtiger Duftstoffe zu erfassen.

In Übereinstimmung mit DEMAIN et al. kann nach der Analyse des Wildtyps von *C. glutamicum* festgestellt werden, dass auch Acyloine wie **84** und **86** bereitgestellt werden,

die dann zu den unterschiedlich alkylierten Pyrazinen führen können, wobei hier der Produktion von **32** der Vorzug gilt. Im Hinblick auf die Hypothese, dass aus dem Vorläufer **84** das Pyrazin **33** vom Organismus gebildet wird, wurde synthetisiertes [$^2\text{H}_7$]-**84** an *C. glutamicum* (WT) verfüttert. Die GC-MS Analyse des CLSA Extrakts zeigt im Fall von **32** einen Einbau von einem Molekül **84**, was sich durch eine Erhöhung der Masse des Moleküls von $m/z = 122$ zu $m/z = 128$ widerspiegelt (vgl. Abbildung 7).

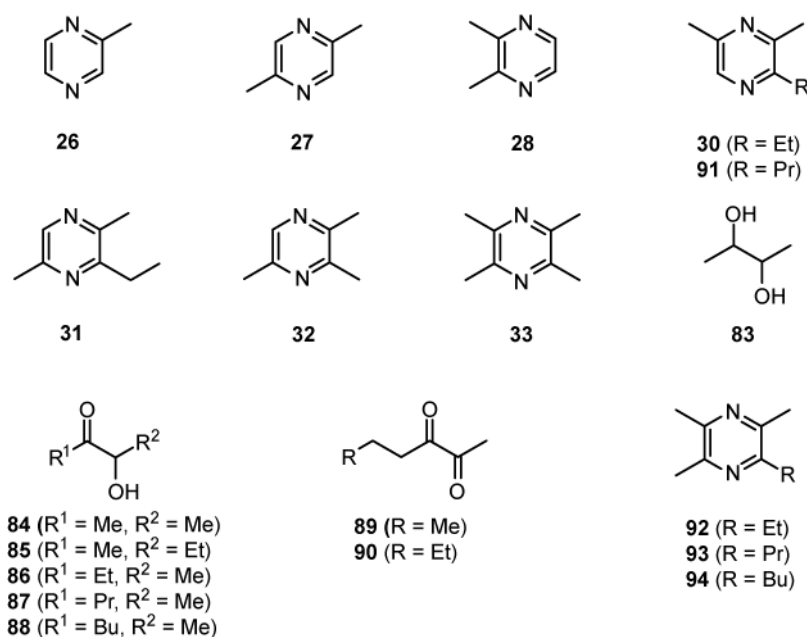


Abbildung 6: Flüchtige Verbindungen aus *C. glutamicum*.

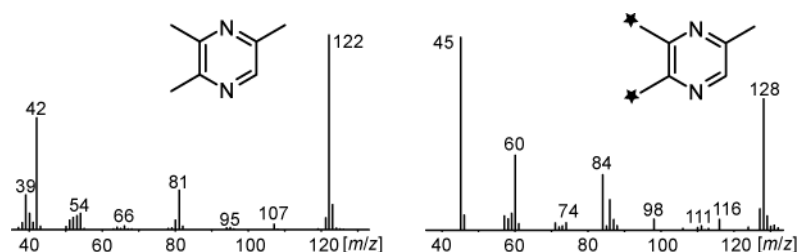


Abbildung 7: EI-Massenspektrum von **32** (links) und [$^2\text{H}_6$]-**32** (rechts).

Weiterhin lässt eine Erhöhung der Molekülmasse von **33** von $m/z = 136$ um lediglich 6 Masseneinheiten auf $m/z = 142$ erkennen, dass auch hier nur der Einbau eines Moleküls von [$^2\text{H}_7$]-**84** stattgefunden hat (s. Abbildung 8). Es wurden Einbauraten von [$^2\text{H}_7$]-**84** von 1-2 % festgestellt. Das vollständig deuterierte Pyrazin **33** mit $m/z = 148$ konnte, vermutlich infolge zu geringer Einbauraten, nicht nachgewiesen werden.

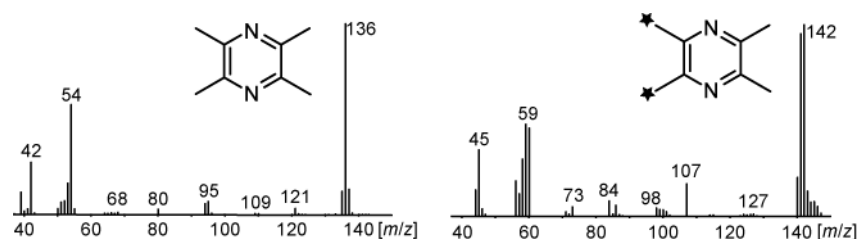


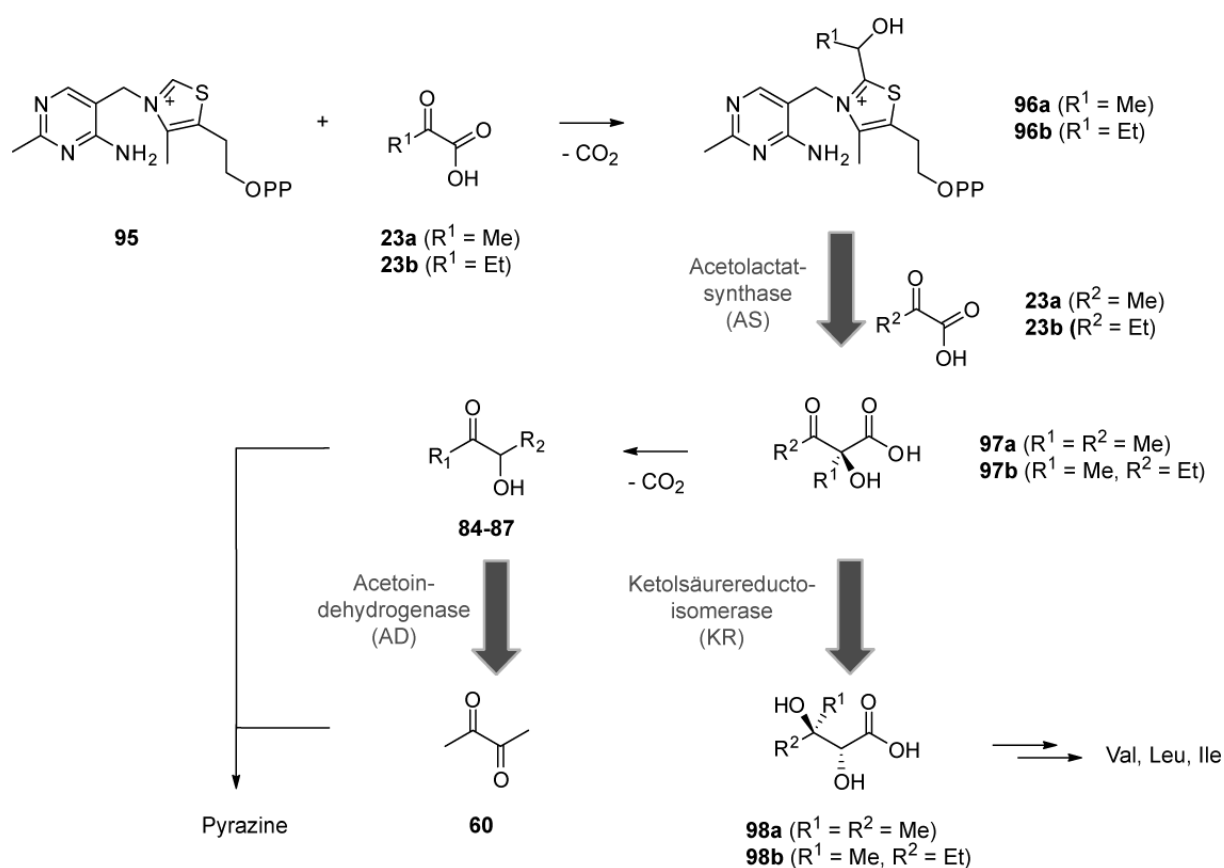
Abbildung 8: Massenspektrum von **33** (links) und [$^2\text{H}_6$]-**33** (rechts).

Tabelle 1: Identifizierte Verbindungen aus dem Headspace-Extrakt des Wildtyps (WT) und der Deletionsmutanten (ΔKR , ΔAS , $\Delta\text{AS}\Delta\text{KR}$) von *C. glutamicum*

Verbindung ^[a]	<i>I</i> ^[b]	Ident. ^[c]	WT (1)	WT (2)	WT (3)	ΔKR	ΔAS	ΔKRAAS
Acetoin (84)	762	MS, St.	+	+	++	+++		
2,3-Butandiol (83)	792	MS, St.				+		
2,3-Hexandion (89)	795	MS, St.				+		
3-Hydroxypentan-2-on (85)	800	MS, Syn.	+	+	+	+		
2-Hydroxypentan-3-on (86)	818	MS, Syn.			+	+		
Methylpyrazin (26)	821	MS, St.		+	+			
2,3-Heptandion (90)	888	MS, St.				+		
2-Hydroxyhexan-3-on (87)	900	MS, Syn.	+++		++	++		
2,5-Dimethylpyrazin (27)	912	MS, St.		+	+			
2,3-Dimethylpyrazin (28)	914	MS, St.	++	++	++	++	+	
2-Hydroxyheptan-3-on (88)	999	MS, Syn.				+		
Trimethylpyrazin (32)	1002	MS, St.	+++	+++	+++	+++	+	
2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin (31)	1077	MS, Syn.	+	++	++	+		
2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (30)	1082	MS, Syn.		+				
Tetramethylpyrazin (33)	1087	MS, St.	++	++	+++	+++	+	
Ethyltrimethylpyrazin (92)	1162	MS, Syn.		+	+	++		
2-Propyl-3,5-dimethylpyrazin (91)	1169	MS, Syn.			+			
Propyltrimethylpyrazin (93)	1243	MS, Syn.				+		
Butyltrimethylpyrazin (94)	1338	MS, Syn.				+		

[a] Relative Mengen der flüchtigen Verbindungen eines Extrakts sind gekennzeichnet mit +: 0-2 %, ++: 2-8 %, +++: > 8 % bezogen auf die Gesamtfläche aller Peaks eines Gaschromatogramms. Die Kennzeichnung der Verbindungen ist nur innerhalb eines Chromatogramms miteinander vergleichbar. [b] Retentionsindices wurden wie in Abschnitt VIII.1.3 beschrieben bestimmt. [c] Die Identifizierung der Verbindungen wurde durch das Massenspektrum (MS) und Vergleich zu kommerziell erhältlichen Standards (St.) oder synthetischen Referenzverbindungen (Syn.) durchgeführt.

Auf dem Weg zur Biosynthese von Isoleucin (Ile), Leucin (Leu) und Valin (Val) erfolgt im ersten Schritt eine Aktivierung von Pyruvat (**23a**) bzw. 2-Oxobutanoat (**23b**) durch den Cofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP) (**95**) unter Decarboxylierung zu 1-Hydroxyethylthiamindiphosphat (**96a**) bzw. 1-Hydroxypropylthiamindiphosphat (**96b**) (vgl. Schema 6). Durch eine Kondensationsreaktion wird eine weitere Einheit **23a** oder **23b** unter Katalyse der Acetolactatsynthase (AS) angefügt. Es entsteht α -Acetolactat (**97a**) oder α -Aceto- α -hydroxybutyrat (**97b**). Die Ketolsäurereductoisomerase (KR) katalysiert die Reaktion zu α,β -Dihydroxyisovalerat (**98a**) und α,β -Dihydroxy- β -methylvalerat (**98b**), was zu den Aminosäuren Ile, Leu und Val führt. Andererseits führt eine vermutlich spontane Decarboxylierung von **97a** oder **97b** zu dem bereits nachgewiesenen Vorläufer **84**, das selber in weiteren Kondensationsreaktionen und Transaminierungen zu den beobachteten Pyrazinen führen könnten.^[34]



Schema 6: Biosyntheseweg zu Pyrazinen und Aminosäuren.

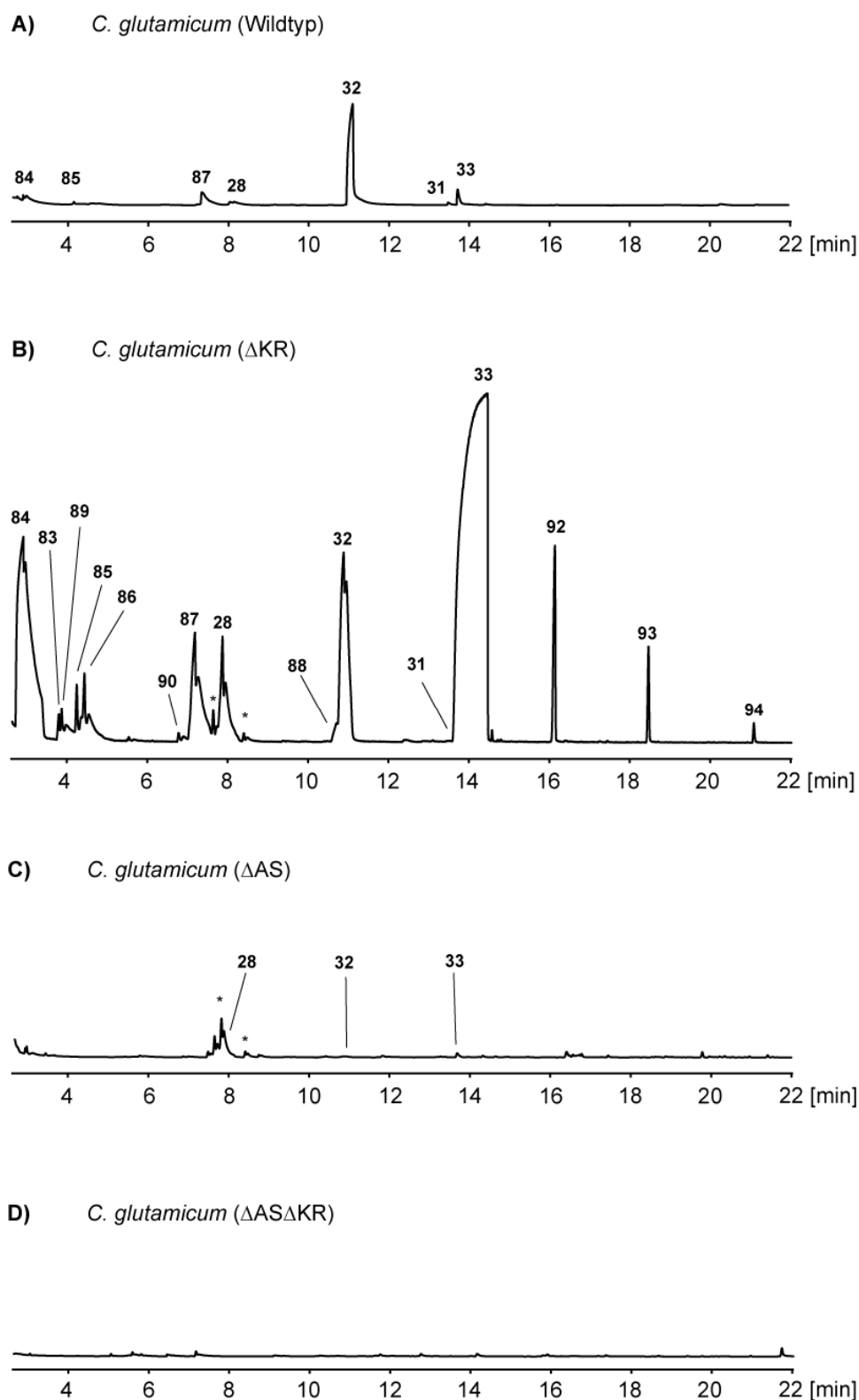


Abbildung 9: Totalionenchromatogramme der Headspace Extrakte von *Corynebacterium glutamicum*. (A) *C. glutamicum* Wildtyp, (B) Deletionsmutante der Ketolsäurereductoisomerase (Δ KR), (C) Knockout Mutante der Acetolactatsynthase (Δ AS), (D) Doppelmutante mit Deletionen der Ketolsäurereductoisomerase und der Acetolactatsynthase (Δ AS Δ KR). Zur besseren Vergleichbarkeit des Wildtyps und der Mutanten wurden die Ordinaten der Chromatogramme auf einen gleichen Wert skaliert. Sternchen bezeichnen Artefakte, die auch in den Headspace-Extrakten der Nährmedien identifiziert wurden.

Um einen weiteren Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Pyrazinen **27**, **28**, **30-33**, sowie **91** und **92** und den vermuteten Vorläufern **84-87** zu prüfen, wurden in Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Braunschweig drei Deletionsexperimente durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das für die Acetolactatsynthase (Δ AS) verantwortliche Gen deletiert, anschliessend die Ketolsäurereductoisomerase (Δ KR), was den Weg zur Biosynthese zu den verzweigten Aminosäuren blockiert, und in einer Doppelmutante wurden sowohl die Gene, die für die AS und für die KR codieren, deletiert (Δ AS Δ KR). Zum Wachstum der Mutanten mussten die verzweigten Aminosäuren Val, Leu und Ile zugeführt werden. Die Untersuchung der flüchtigen Duftstoffe erfolgte wiederum mittels der CLSA-Methode und GC-MS Analyse.

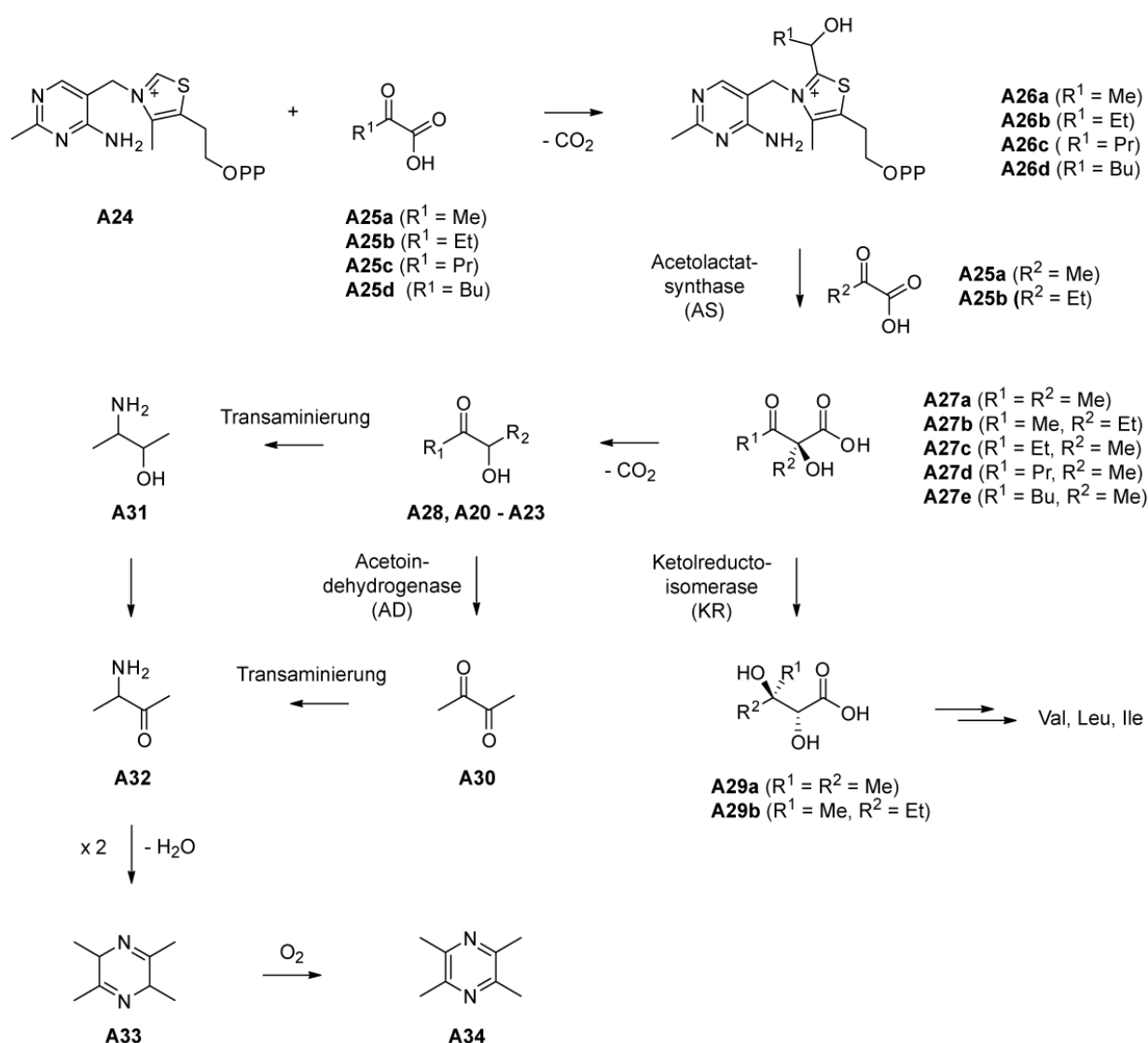
Die Vielfältigkeit und relative Menge der von der Δ KR Mutante gebildeten Pyrazine und Acyloine ist wesentlich größer im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 9B und Tabelle 1). Die bevorzugt produzierten Pyrazine sind wiederum **32** und **33**, gefolgt von **28** und **92**. Zusätzlich bringt Δ KR die zwei zuvor nicht identifizierten Pyrazinisomere Propyltrimethylpyrazin (**93**) und Butyltrimethylpyrazin (**94**) hervor. Andererseits werden die im Wildtyp nachgewiesenen Pyrazine **26**, **27**, **30** und **91** von der Δ KR Mutante nicht bereitgestellt. Hingegen wird der vermutliche Vorläufer **84** in großen Mengen von der Mutante produziert. Ferner wurden **84-87** wie auch im Wildtyp identifiziert. Im Gegensatz zum Wildtypen synthetisiert die Δ KR Mutante zusätzlich noch das verlängerte Acyloin 2-Hydroxyheptan-3-on (**88**), das Diol 2,3-Butandiol (**83**), sowie 2,3-Hexandion (**89**) und 2,3-Heptandion (**90**).

Die Δ AS Mutante ist durch die Blockierung zu den nachgeschalteten Stufen der Aminosäuresynthese und Pyrazinsynthese kaum noch in der Lage Pyrazine hervorzubringen (Abbildung 9C und Tabelle 1). Es konnten lediglich die Pyrazine **28**, **32** und **33** in Spuren nachgewiesen werden. Acyloine sowie Diole oder Dione wurden nicht identifiziert.

Im Headspace-Extrakt der Doppelmutante Δ AS Δ KR (Abbildung 9D und Tabelle 1) konnte keine Pyrazin- sowie Acyloinbildung verzeichnet werden. Eine Komplementierung mit **84** zum Medium stellte die Pyrazinproduktion aber wieder her.

Die Blockierung der Wege hin zu **97a** und **97b** und zur Biosynthese der Aminosäuren Val, Ile und Leu lässt den Rückschluss zu, dass die identifizierten Pyrazine in der Δ AS Mutante möglicherweise aus dem Abbau der Aminosäuren Val, Ile und Leu gebildet wurden. Eine

weitere Möglichkeit zur Pyrazinbildung liefert die nicht enzymatische Reaktion zwischen nicht reduzierenden Zuckern und Aminosäuren unter Hitzewirkung. Die MAILLARD-Reaktion könnte bereits beim Autoklavieren des Mediums zu Pyrazinen führen. Durch Messung der flüchtigen Bestandteile einer Mediumagarplatte, die keine Pyrazine oder Acyloine identifizieren ließ, konnte eine chemische Bildung von Pyrazinen ausgeschlossen werden. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Pyrazine, die hier besprochen werden, ausschließlich auf enzymatischen Wegen gebildet wurden.



Schema 7: Biosyntheseschema von Acyloinen zu Pyrazinen.

Anhand der erhaltenen Resultate und in Zusammenhang mit den Ergebnissen von DEMAIN et al. lässt sich hinsichtlich der Biosynthese der Pyrazine folgendes schlussfolgern (Schema 7):

Nach der Bildung von **97a** oder dessen Isomeren findet eine Decarboxylierung zu **84** statt. Anschließend besteht einerseits die Möglichkeit, der Transaminierung zu 2-Amino-3-butanol (**99**) mit nachfolgender Oxidation zu dem korrespondierenden Aminoketon **62**, oder erst eine Oxidation von **84** zum Dion **60** und erst dann Transaminierung zu **62**. Da in *C. glutamicum* ein Gen, das für eine Acetoindehydrogenase codiert, identifiziert wurde und ferner in der Analyse der Δ KR Mutante die Dione **89** und **90** nachgewiesen wurden, kann auch dieser Weg in Betracht gezogen werden.

In den nachgeschalteten Schritten der Pyrazinbiosynthese zu **33** kann davon ausgegangen werden, dass zwei Moleküle **62** in einer Kondensationreaktion zu dem Dihydrotetramethylpyrazin **100** führt, was anschließend in einer spontanen Oxidation das aromatische Ringsystem ausbildet und **33** als Produkt liefert. Die Vielfältigkeit der alkylierten Pyrazine des Wildtyps sowie der Δ KR Mutante lässt den Rückschluss zu, dass höhere Homologe des Pyruvats als Ausgangsmaterial zur Biosynthese der Pyrazine dienen müssen. Die Bildung von **91** bzw. **92** sollte demnach mit 2-Oxopentanoat (**23c**) bzw. 2-Oxohexanoat (**23d**) starten, um im Endprodukt eine Propyl- bzw. Butylseitenkette zu erzeugen. Das Pyrazin **92** z. B. kann auf zwei Wegen entstehen, wobei der erste mit **23a** startet und die Acetolactatsynthase nach Aktivierung an TPP eine C₄-Einheit 2-Oxobutanoat (**23b**) anfügt oder es wird im ersten Schritt **23b** durch TPP aktiviert und anschließend die C₃-Einheit **23a** eingebaut. In den vollständig substituierten Pyrazinen **92-94** ist jeweils zu sehen, dass höchstens eine Einheit > C₄ von dem Enzym eingebaut werden kann. Selbst im Headspaceextrakt der Δ KR Mutante ist kein Pyrazin mit einer Diethyl- oder Dipropylsubstituierung nachgewiesen worden. Scheinbar übersteigt dies das Limit des betreffenden Enzyms. Die Pyrazine mit unvollständiger Substituierung wie **26-28** oder **32** setzen den Einbau von C₂- oder C₃-Einheiten voraus. So könnte **32** aus einer Einheit **84** und Lactaldehyd oder Hydroxyaceton synthetisiert worden sein. Das Pyrazin **26** besteht demnach aus einer C₂-Einheit wie Glycolaldehyd oder Glyoxal und einer C₃-Einheit. Das Vorhandensein der kurzkettigen Grundbausteine konnte in den Analysen der Headspaceextrakte nicht nachgewiesen werden, da diese Verbindungen im GC mit dem Lösemittel coeluieren und dadurch nicht detektierbar sind.

3.1.2 Synthese der flüchtigen Duftstoffe aus *C. glutamicum*

Die Verbindung **31** wurde ausgehend von **27** synthetisiert (Schema 8). OHTA et. al beschreiben eine Methode, die Pyrazine mit Hilfe des Peroxid-Reagenz $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (bzw. NaBO_3) und Erhitzen unter Rückfluss in Eisessig in ihre *N*-Oxide überführt.^[91] Dabei wird 2,5-Dimethylpyrazin-*N*-Oxid (**101**) ausgehend von **27** in guten Ausbeuten erhalten (85%). Anschließend wird **101** mit POCl_3 behandelt, um 2-Chlor-3,6-dimethylpyrazin (**102**) mit einer Ausbeute von 62 % hervorzubringen. Nach FÜRSTNER und LEITNER lassen sich Grignard-Reagenzien mit Pyrazinylchloriden erfolgreich in einer eisenkatalysierten Kreuzkupplung alkylieren. Die Kreuzkupplung von **102** mit EtMgBr lieferte 80 % des gewünschten Produktes **31**. Die Pyrazine **30** und **91** wurden in gleicher Weise dargestellt und lieferten im Falle der Umsetzung mit EtMgBr 82 % der Verbindung **30** und 57 % des Pyrazins **91** für die Kupplung mit PrMgBr .

Eine große Notwendigkeit der Synthese von Referenzsubstanzen zeigte sich beim Vergleich der Massenspektren von **91** und **103** (vgl. Abbildung 10). Die Fragmentierungsmuster beider Regioisomere sind sehr identisch. Die prominentesten Peaks beider Massenspektren liefern das Molkekülion $[\text{M}^+]$ mit $m/z = 150$ sowie nach Abspaltung einer Methyleinheit $[\text{M}^+ - 15]$ ein Fragmention mit $m/z = 135$. Der Basispeak wird vermutlich infolge einer McLafferty Umlagerung geliefert und resultiert in einem Fragmention mit der Masse $m/z = 122$ wiederum bei beiden Verbindungen. Die Fragmentionen in den unteren Massenbereichen entstehen offensichtlich mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit, was sich in niedrigen Peakintensitäten widerspiegelt und wenig Raum für die Interpretation zur Unterscheidung der beiden Moleküle anhand der Fragmentierungsmuster zulässt. Der Retentionsindex liefert einen weiteren Parameter zur Unterscheidung der Verbindungen **91** und **103**, da dieser das spezifische Retentionsverhalten einer Substanz für gleiche stationäre Phasen widerspiegelt und somit zusätzlich zur eindeutigen Identifizierung in Kombination mit dem Massenspektrum herangezogen werden kann. Nach Synthese der Referenzen von **91** und **103** und Vergleich der Massenspektren und Retentionsindices zeigte sich, dass es sich bei dem von *C. glutamicum* produzierten Duftstoff um das Pyrazin **91** handelt (vgl. Tabelle 1).

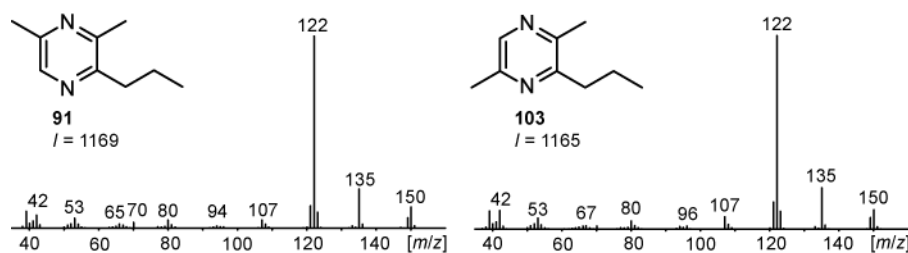
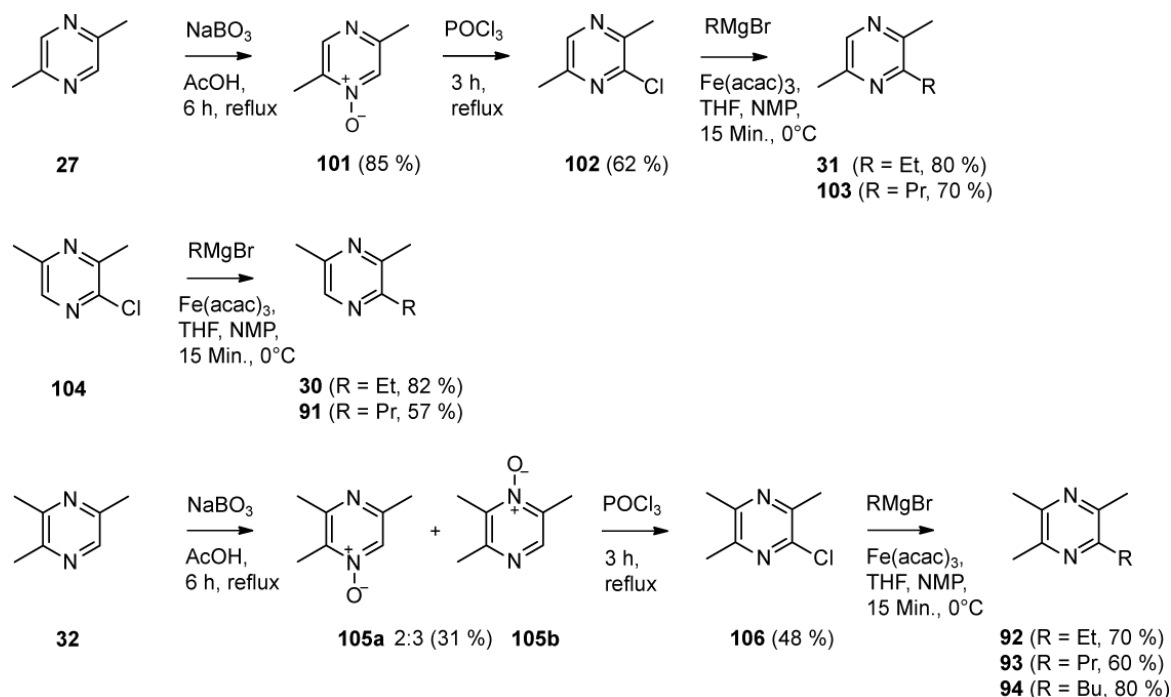


Abbildung 10: Massenspektren und Retentionsindizes der Regioisomere **91** und **103**.

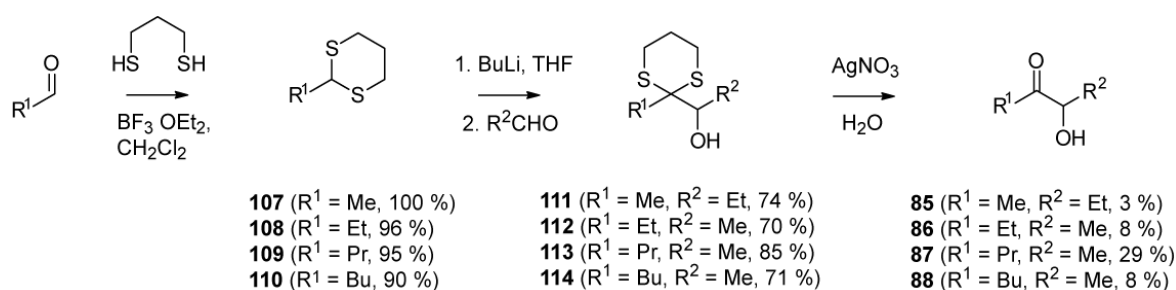
Die Synthese der vollständig substituierten Pyrazine **92-94** startete mit Trimethylpyrazin **32**, das durch *N*-Oxidation in die säulenchromatographisch nicht trennbaren Regioisomere **105a** und **105b** mit 31 % Ausbeute (Isomerenverhältnis 2:3) überführt wurde. Die Mischung der *N*-Oxide **105a** und **105b** wurde anschließend mit POCl_3 in Chlorotrimethylpyrazin **106** mit 48 % Ausbeute überführt. Folgende Kreuzkupplung mit EtMgBr , PrMgBr , sowie BuMgBr lieferte die Alkylpyrazine **92-94** in 60-80 % Ausbeute (vgl. Schema 8).



Schema 8: Synthese der Pyrazine aus *C. glutamicum*.

Die Syntheseroute zu den Acyloinen **85-88** ist in Schema 9 abgebildet. Die Darstellung von **85** begann mit der Umsetzung von Acetaldehyd mit 1,3-Dithian zu 2-Methyl-1,3-dithian

(**107**). Anschließend erfolgte eine SEEBACH-Umpolung mit Propanal zu 2-(1-Hydroxypropyl)-2-methyl-1,3-dithian (**111**). Die Abspaltung des Dithianrestes gelang durch Rühren in wässriger AgNO_3 -Lösung, wobei der Fortschritt der Reaktion mittels GC verfolgt wurde. Nach vollständiger Umsetzung von **111** in 2-Hydroxy-3-butanon (**85**) wurde das Acyloin mit Diethylether extrahiert und aufgereinigt. Wegen der hohen Flüchtigkeit des Produktes **85** wurden im abschließenden Destillationsprozess, um das Lösemittel zu entfernen, signifikante Mengen verloren, sodass nur wenig (3 % Ausbeute) der reinen Substanz **85** isoliert werden konnten.



Schema 9: Synthese der Acyloine aus *C. glutamicum*.

Die Acyloine **86-88** wurden in gleicher Weise synthetisiert ausgehend von Propanal, Butanal, sowie Pentanal. Insgesamt konnten in dieser Syntheseroute im ersten Schritt zu den Dithianen **107-110** sehr gute konsistente Ausbeuten erhalten werden (90-100 %). Die SEEBACH-Umpolung lieferte die hydroxylierten Dithiane **111-114**. Die Abspaltung der Dithianeinheit gelang in allen Fällen mit 100 % Umsetzung (GC). Jedoch war die Isolierung der Produkte durch die sehr hohe Flüchtigkeit von beträchtlichen Verlusten begleitet. Lediglich 2-Hydroxy-3-hexanon (**87**) konnte mit einer Ausbeute von 29 % erhalten werden.

4. Zusammenfassung Pyrazine aus *C. glutamicum*

Das Duftstoffprofil von *C. glutamicum* ist aus vielen verschiedenen Pyrazin- und Acyloin-Derivaten zusammengesetzt, wobei die Hauptkomponenten dabei Trimethylpyrazin (**32**),

Tetramethylpyrazin (**33**) und Acetoin (**84**) bilden. Weiterhin wurden einige verschiedene Pyrazin- und Acyloin-Derivate anhand von Massenspektren der kommerziell erhältlichen oder synthetisierten Referenzen identifiziert. Fütterungsexperimente mit [$^2\text{H}_7$]-**84** zeigten, dass die Pyrazine **32** und **33** abgeleitet von Acetoin entstehen. Untersuchungen von Knockout-Mutanten des Primärmetabolismus, wie der ΔKR Mutante, resultierten in einer signifikant höheren Produktion der verschiedenen Pyrazine und Acyloine. Hingegen zeigte das Duftstoffprofil der Mutante mit einer Inaktivierung der Acetolactatsynthase (ΔAS) nur noch eine Minimalproduktion an Pyrazinen und Acyloinen. Die Doppelmutante ($\Delta\text{AS}\Delta\text{KR}$) war nicht mehr in der Lage Pyrazine zu produzieren, wobei die Biosynthese von Pyrazinen durch den Zusatz von Acetoin zum Medium wieder hergestellt werden konnte.

III. *Fusarium fujikuroi* als Lieferant für flüchtige pyridinhaltige Verbindungen

1. Der Schimmelpilz *Fusarium fujikuroi*

Der Ascomycot *Fusarium fujikuroi* wurde erstmals 1917 als der Auslöser der Bakanae-Krankheit (japan. „Dummsämling“) an mit dem Pilz infizierten Reispflanzen (*Oryza sativa*) identifiziert. Dabei zeigten Reiskeimlinge in den ersten Stadien der Krankheit ein abnormes Längenwachstum und Fahlwerden der Blätter.^[92] Verantwortlich für die Bakanae-Krankheit war der von *F. fujikuroi* produzierte Sekundärmetabolit (Abbildung 11) Gibberellinsäure (**115**, GA₃)^[93], die als Phytohormon Einfluss auf das Größenwachstum und verschiedene andere Prozesse im Wachstumszyklus der Pflanze, wie dem Keimprozess, der Stielverlängerung und der Fruchtbildung u. a. nimmt.^[93,94]

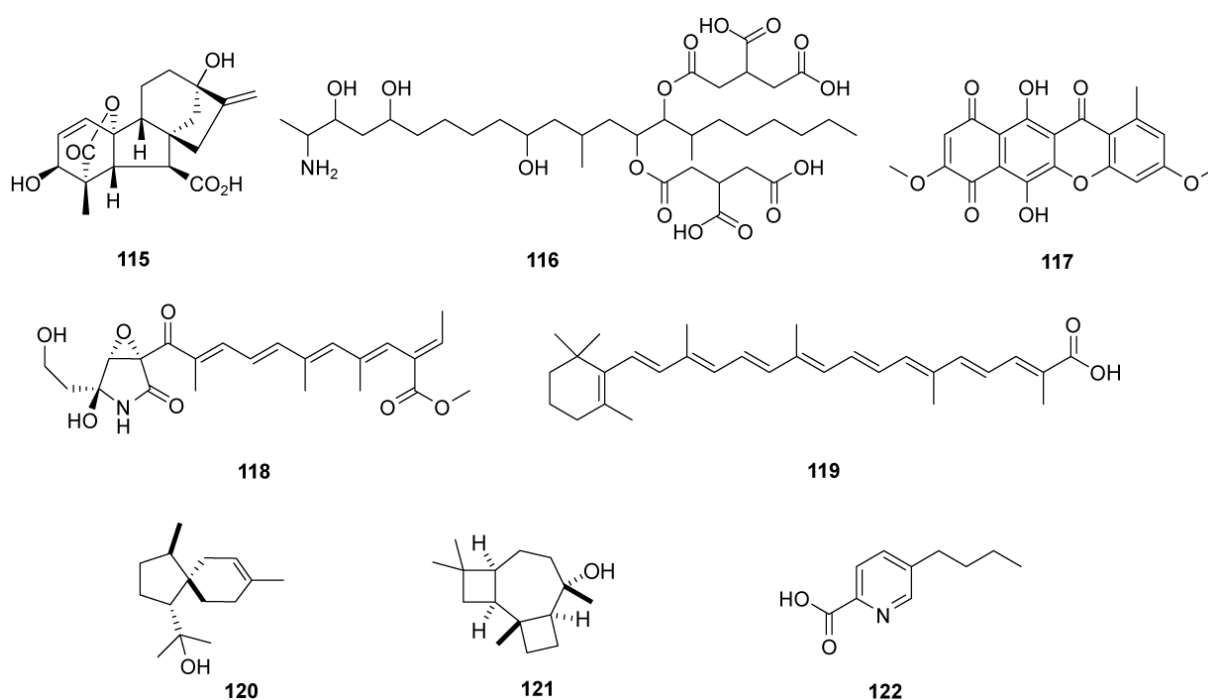


Abbildung 11: Sekundärmetabolite von *F. fujikuroi*.

Seither konnte eine Reihe weiterer Sekundärmetabolite aus unterschiedlichen Substanzklassen identifiziert werden. Die Klasse der Polyketide wird u. a. von dem Mykotoxin Fumonisin B1^[95] (**116**) sowie dem Farbpigment Bikaverin^[96] (**117**) repräsentiert. Ferner wurde das potente Mykotoxin Fusarin C (**118**), das biosynthetisch als PKS/NRPS-Hybrid anzusehen ist, nachgewiesen.^[97,98] Neuere Untersuchungen zeigten sogar eine Produktion von Tetrapeptiden

aus *F. fujikuroi*, dessen Strukturen ähnlich der des Apicidin F ist, das wegen einer antiparasitären Wirkung auf *Plasmodium berghei* u.a. bekannt ist.^[99] Neben den Phytohormonen (Gibberellin GA₃ (**115**)) produziert der Pilz weitere Terpene wie z. B. das Abbauprodukt des γ -Carotins, Neurosporaxanthin (**119**).^[100,101] Aus Gasraumanalysen von *F. fujikuroi* konnte ferner das Sesquiterpen α -Acorenol (**120**) identifiziert und dessen Biosynthese nachgewiesen werden.^[35,102] Des Weiteren konnten aus *F. fujikuroi* die Sesquiterpensynthasen *Ffsc6* für die Bildung von **120** und *Ffsc4* für die Produktion von Koraiol (**121**) identifiziert werden.^[102] Hingegen konnte die biosynthetische Darstellung des Mykotoxins Fusarinsäure (5-Butylpicolinsäure) (**122**) bislang noch nicht abschließend aufgeklärt werden.^[103–105]

2. Pyridine als Naturstoffe

Naturstoffe mit einem Pyridinring besitzen die unterschiedlichsten chemischen Strukturen und sind ubiquitär zu finden (Abbildung 12). Allen Lebewesen gemeinsam ist das Cosubstrat NAD⁺/NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, **123**), dass sich aus zwei Nucleotiden zusammensetzt, wobei Pyridin im Nicotinsäureamidteil des Coenzym enthalten ist. Das Redoxsystem NAD⁺/NADH ist an anabolen sowie katabolen Mechanismen des Stoffwechsels beteiligt und dient als Wasserstoffüberträger und -akzeptor u.a. in der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, sowie der Glykolyse aller Lebewesen.^[106] Eine weitere biologische Bedeutung hat das Pyridin in Form des Vitamins B6 (Pyridoxin, **124**), dass nach Umwandlung in Pyridoxalphosphat als Cofaktor des Aminosäurestoffwechsels an Transaminierungen, sowie Decarboxylierungsreaktionen beteiligt ist.^[20] Andererseits findet sich die Pyridineinheit in zahlreichen Sekundärmetaboliten von Pflanzen, Tieren und Bakterien wieder. Dabei sind vielfältige Wirkungen der abgesonderten Sekundärmetabolite bekannt. Aus den Samen des Wunderbaums *Ricinus communis* konnte neben dem Lectin Ricin das ebenfalls toxische *N*-methylierte Pyridinalkaloid Ricinin (**125**) extrahiert werden.^[107,108] Seit mehreren Jahrzehnten erfreut sich Moschus als Duftstoff großer Beliebtheit und wurde ursprünglich aus dem Sekret der Talgdrüsen des männlichen sibirischen Moschustiers (*Moschus moschiferus*) gewonnen. Eine der geruchsgebenden Komponenten des Moschus ist der Bicyclus Muscopyridin (**126**).^[109] Das große Interesse an Moschus und dem damit verbundenen fortschreitenden Aussterben des Moschustiers hat die Anfrage nach synthetischem Material gesteigert. Eine erfolgreiche Synthese des

Pyridinbizyklus **126** wurde von FÜRSTNER et. al durchgeführt.^[110] Auch aus dem marinen Sektor konnten pyridinhaltige Naturstoffe extrahiert werden. Der nordpazifische Schwamm *Cribochalina* sp. produziert das antifungal wirksame Cribochalin A und B (**127**), während die im Meer lebende Kopfschildschnecke *Haminoea navicula* das Alarmpheromon Haminol A (**128**) ausstößt, wenn sie belästigt wird. Bakterien und Pilze stellten sich ebenso als Quelle für Naturstoffe mit einem Pyridingerüst heraus. Aus Extrakten von marinen sowie terrestrischen Streptomyceten *Kitasatospora* sp. IFM10917 wurden cytotoxisch wirksame Fuzanine (Fuzanin C, **129**) extrahiert.^[111] In neuesten Analysen von *Streptomyces* sp. FORM5 wurden Diastereomere des 2-Pentadienylpyridin wie 2-((1*E*,3*E*)-penta-1,3-dien-1-yl)pyridin (**130**) aus der Reihe der Streptopyridine als Hauptkomponenten des Extraktes der Gasraumanalysen identifiziert.^[112] Der Pilz *Verticillium lecanii* produziert neben Picolinsäure (**131**) auch das Isomer Dipicolinsäure (**132**).^[113] Diese Eigenschaft macht den entomopathogenen Pilz als biologisches Bekämpfungsmittel gegen die mehligke Kohlblattlaus (*Brevicoryne brassicae*) interessant und wurde bereits erfolgreich in Feldversuchen getestet.^[114]

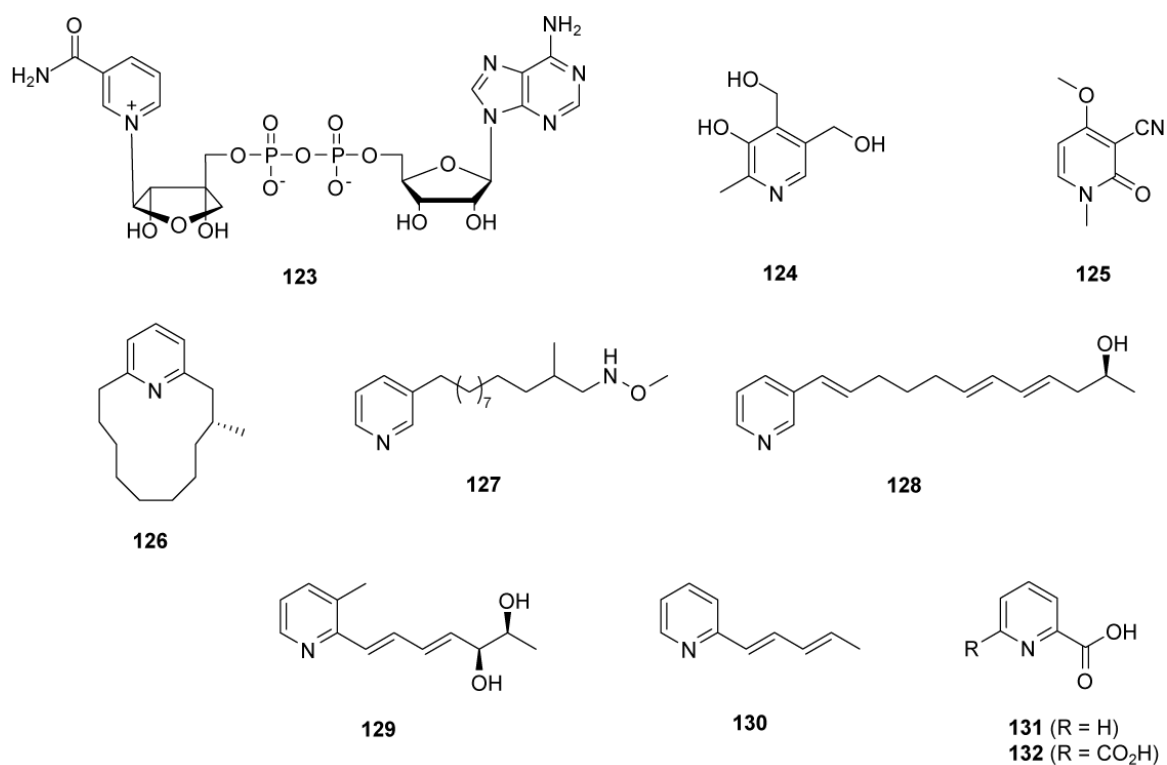


Abbildung 12: Pyridinderivate aus der Natur.

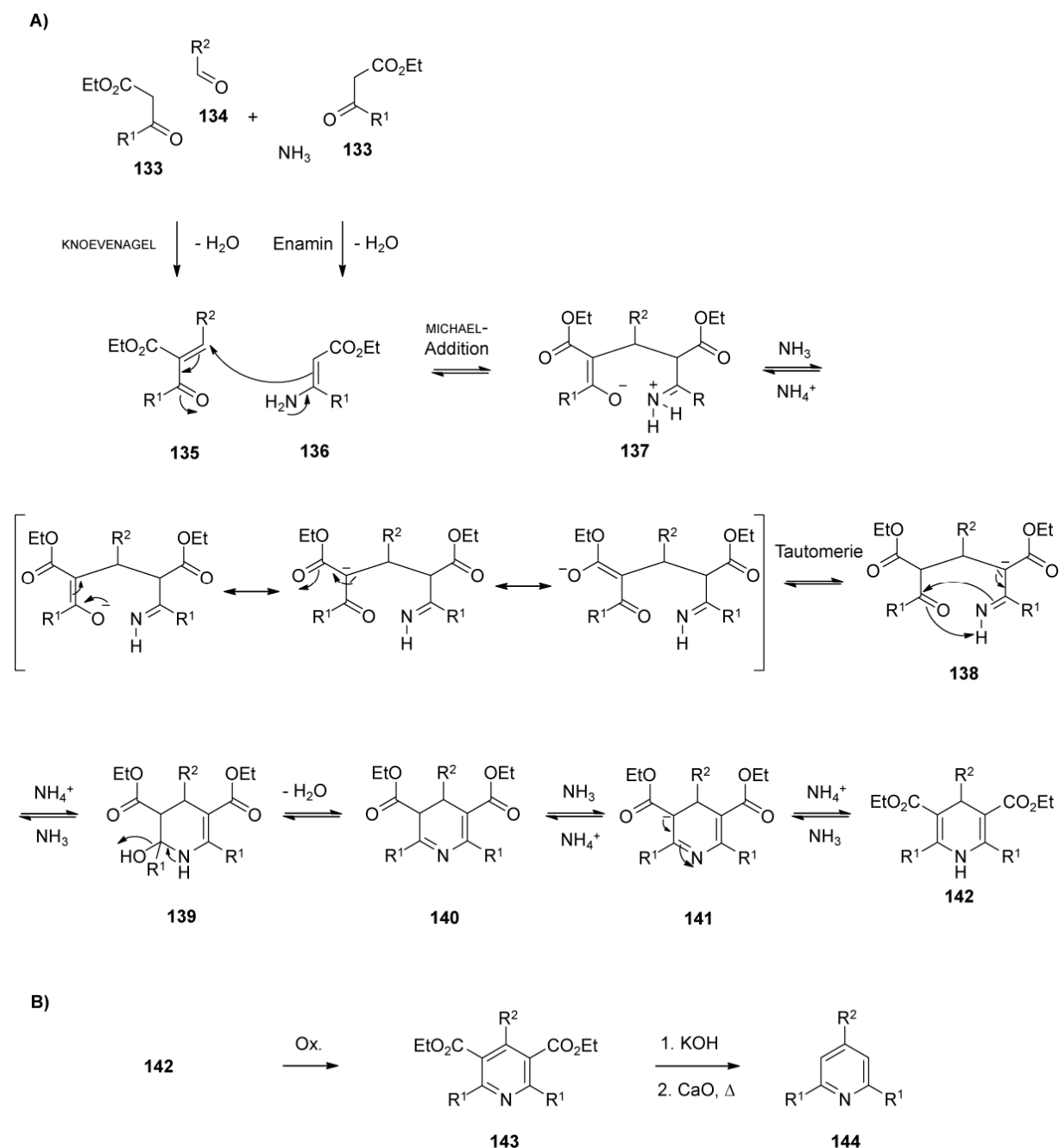
2.1 Pyridinsynthese

Die Entdeckung der ersten Pyridinbase geht auf ANDERSON im Jahre 1876 zurück, der diese bei der Extraktion von Knochenöl entdeckte. Bis in die 1930er Jahre konnte der Bedarf an Pyridin über die Destillation von Steinkohleteer gedeckt werden. Eine höhere Nachfrage entwickelte sich durch den menschlichen Bedarf des Vitamins B3 (Niacin), das als Präventivmaßnahme von Dermatitis, sowie Demenz zum Einsatz kam. Im Verlauf der Jahre wurden immer mehr bioaktive pyridinhaltige Sekundärmetabolite entdeckt, die schließlich nur über Synthese kommerziell zugänglich gemacht werden konnten.^[115]

Die wohl bekannteste Pyridinsynthese gelang Arthur HANTZSCH 1882.^[116,117] Mit dieser Mehrkomponentenmethode lassen sich 1,4-Dihydropyridine in einer Eintopfreaktion darstellen, die in Folgeschritten zu aromatischen Pyridinen oxidiert werden können (vgl. Schema 10A). Dabei werden im ersten Schritt ein β -Ketoester (**133**), ein Aldehyd (**134**) und Ammoniak im Verhältnis 2:1:1 zur Reaktion gebracht. Einerseits findet eine KNOEVENAGEL Reaktion zwischen **133** und **134** statt und liefert den α,β -ungesättigten Ketoester **135**. Andererseits bildet sich unter nucleophiler Addition des Ammoniaks an die Carbonylgruppe von **133** und anschließender Wasserabspaltung das Enamin **136**. In einer MICHAEL-Addition verbinden sich **135** und **136** zu dem Iminenol **137**, das durch Keto-Enol-Tautomerie im tautomeren Gleichgewicht zu der Iminketoverbindung **138** steht. Der Ringschluß wird durch nucleophile Addition des Stickstoffs an die Ketogruppe gebildet und liefert Alkohol **139**. Nach Wasserabspaltung und Protonenabstraktion wird über die Verbindungen **140** und **141** das 1,4-Dihydropyridin **142** ausgebildet. Das aromatische System kann in Anschlußreaktionen durch Oxidation erhalten werden (Schema 10B). Dafür kommen eine Reihe von Oxidationsmitteln wie z. B. Salpetersäure^[118], Kaliumpermanganat^[119], sowie katalytische Oxidationsmittel mit Ruthenium(III)-chlorid^[120] oder Palladium auf Kohle (Pd-C)^[121] zur Anwendung und führen zum Pyridindiester **143**. Eine Decarboxylierung von **143** liefert schliesslich das trisubstituierte Pyridin **144**.

Eine andere Möglichkeit zur Darstellung von Pyridinen wurde von BOHLMANN und RAHTZ entwickelt, die Enamine mit Ethynylketonen oder -aldehyden kondensierten. Im ersten Schritt wird durch MICHAEL-Addition und C-Alkylierung des Enamins ein Aminodien erzeugt, dass im Vakuum und Temperaturen bis 170 °C einer Cyclokondensation unterworfen wird und, im Gegensatz zur HANTZSCHEN Synthese, direkt zum aromatischen Pyridinring führt.^[122]

Mittlerweile hat die BOHLMANN-RAHTZ Pyridinsynthese in einigen Syntheserouten in der Naturproduktchemie mitgewirkt wie beispielsweise die Synthesen des Thiopeptidantibiotika Thiostrepton A aus Actinomyceten und Micrococcin P₁ aus *Streptomyces viridochromogenes*.^[123]



Schema 10: HANTZSCHE Pyridinsynthese.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Extraktanalyse

Auf dem Weg zur Extraktion neuer Gibberellinsäurestandards, wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise der potente Gibberellinsäureproduzent *Fusarium fujikuroi* von Prof. Dr. Bettina Tudzynski zur Verfügung gestellt. Im ersten Schritt wurden Agarplatten mit Ethylacetat (EtOAc) extrahiert, der Extrakt eingeeengt und auf Gibberellinsäureproduktion nach Derivatisierung mit *N*-Trimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamid (MSTFA) untersucht. Neben Gibberellinsäurederivaten mit höheren Retentionszeiten, zeigte der EtOAc-Extrakt im Totalionenstrom, die in Abbildung 13 abgebildeten Peaks.

Nach Abgleich der Massenspektren mit der zur Verfügung stehenden Datenbank, konnte Fusarinäure (**122**) ($I = 1622$) mit einem Molekülion von $m/z = 179$ und einem Basispeak von $m/z = 135$ identifiziert werden (Abbildung 14B). Weiterhin findet sich ein ausgeprägter Peak mit einem Molekülion von $m/z = 251$ und einem Basispeak mit einer Masse von $m/z = 236$ (vgl. Abbildung 14C). Die Fragmentierung dieses Moleküls, sowie das Molekülion lassen auf den Trimethylsilylester von **122** schliessen, da ein Massenzuwachs von 72 Masseneinheiten, entsprechend einer Trimethylsilyleinheit, zu verzeichnen ist. Ferner ist ein Fragmention mit einer Masse von $m/z = 73$ im Massenspektrum zu erkennen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die MSTFA-Derivatisierung des Extrakts nicht quantitativ verlaufen ist.

Durch eine Decarboxylierung von **122** würde eine Verbindung entstehen, die ein Molekülion von $m/z = 135$ aufweisen würde und somit einen Unterschied von - 44 Masseneinheiten entsprechend einer CO₂ Einheit im Massenspektrum zeigen würde. Dieses findet sich im Massenspektrum der Verbindung **145** ($I = 1155$) (s. Abbildung 13 und Abbildung 14A), die zusätzlich einen Basispeak mit einer Masse von $m/z = 92$ besitzt. Im Vergleich zu **122** unterscheiden sich die Massenspektren lediglich hinsichtlich ihrer Intensitäten der Massenfragmente ab dem Molekülion von **145** mit $m/z = 135$.

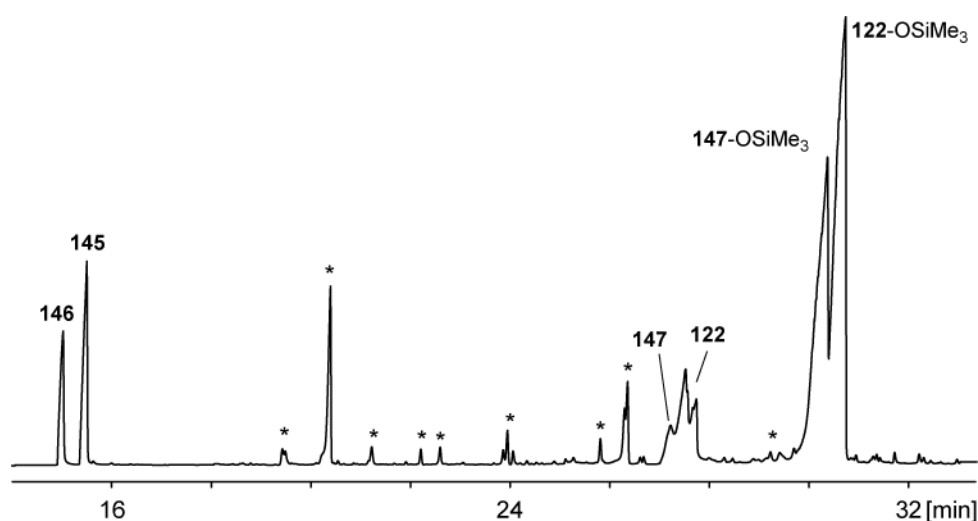


Abbildung 13: Totalionenstrom des EtOAc-Extrakts von *Fusarium fujikuroi* nach MSTFA-Derivatisierung.

Außer den Verbindungen **122** und **145** zeigt das Totalionenchromatogramm des MSTFA-Extraktes von *F. fujikuroi* mit **147** ($I = 1599$) eine Verbindung mit einem MolekÜlion von $m/z = 177$ und einem Basispeak von $m/z = 133$, die sich im Massenspektrum nur um zwei Masseneinheiten zu **122** unterscheidet. Zusätzlich ist der Peak des MSTFA-Derivats **147-OSiMe₃** im Gaschromatogramm zu erkennen. Das MolekÜlion ($m/z = 249$) zeigt ebenso, wie in **122-OSiMe₃** eine Massenverschiebung von 72 Einheiten, was auf das MSTFA-Derivat dieser Verbindung schließen läßt. Weiterhin zeigt sich im Chromatogramm ein Peak ($I = 1139$) mit einer Molekülmasse von $m/z = 133$, die nach einer Decarboxylierung von **147** entstehen könnte. Das heißt, dass das gesuchte Molekül scheinbar ebenso wie **122** eine Carboxylfunktion in Position 2 trägt, sowie ebenfalls einen Pyridinring beinhaltet. Der Unterschied der Verbindungen müßte somit in der Alkylkette festzustellen sein. Ein Unterschied von 2 Masseneinheiten (die Masse zweier Protonen) könnte die Einführung einer Doppelbindung mit sich bringen, womit die Molekülmasse der Verbindung von **145** mit $m/z = 135$ auf die Molekülmasse von $m/z = 133$ der Verbindung **146** fallen würde. Die Position der Doppelbindung in der Alkenylkette kann anhand des Massenspektrums nicht bestimmt werden, wobei die Massendifferenz von $m/z = 133$ zu $m/z = 92$ mit 41 Einheiten einer allylischen Abspaltung entsprechen könnte.

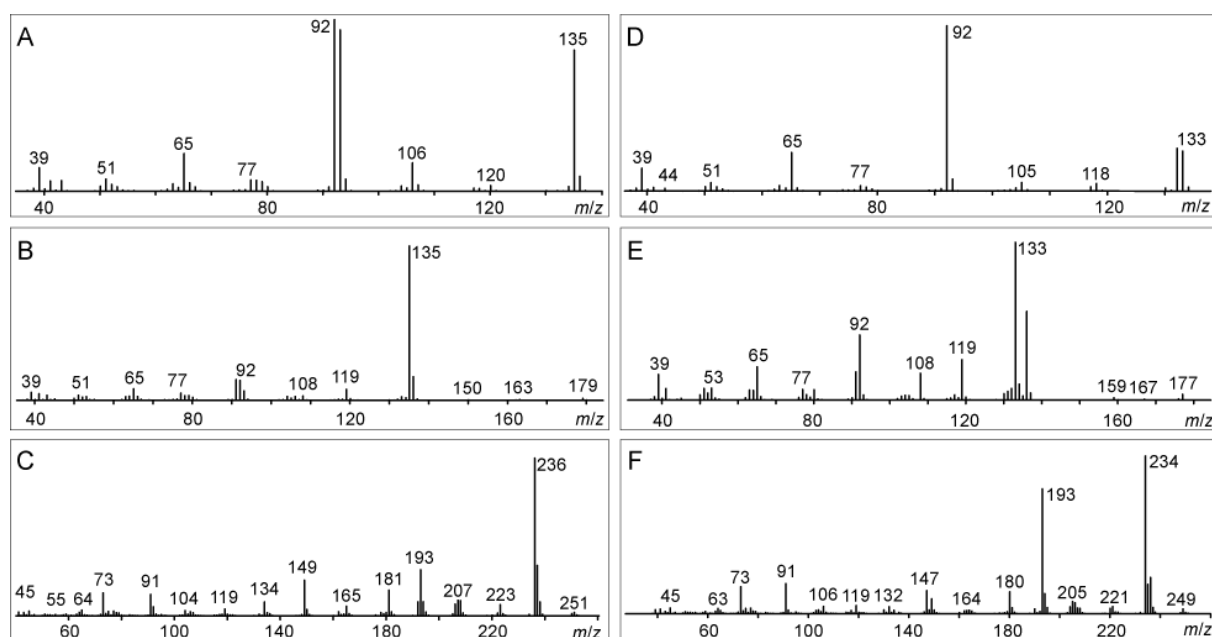


Abbildung 14: EI-Massenspektren von (A) 3-Butylpyridin (**145**), (B) Fusarinsäure (**122**), (C) Fusarinsäuretrimethylsilylester (**122-OTMS**), (D) tendenziell identifiziertes Homoallylpyridin (**146**), (E) möglicherweise Dehydrofusarinsäure (**147**), möglicherweise Dehydrofusarinsäuretrimethylsilylester (**147-OTMS**).

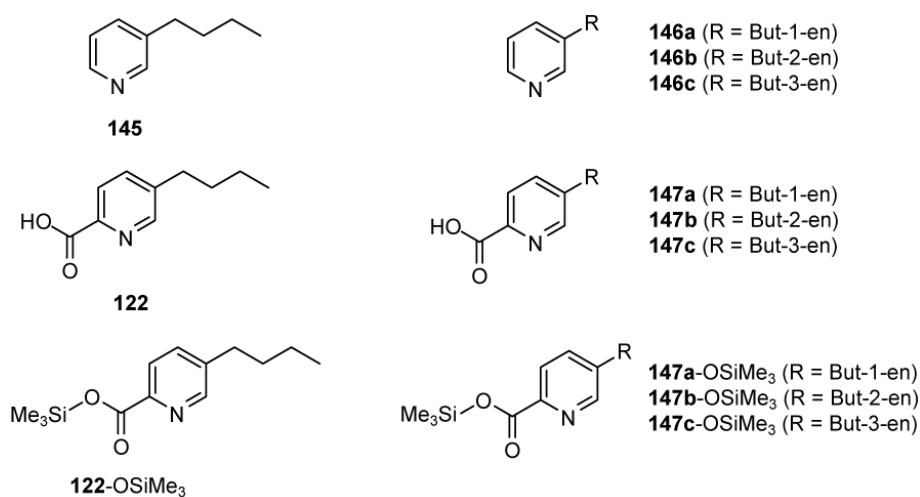


Abbildung 15: Strukturen der vermuteten Pyridinderivate

3.2 Synthese der Pyridinderivate

Die Synthese der Referenzen sollte mit der von Fusarinsäure (**122**) beginnen. SONG et al. beschreiben zur Synthese von **122** eine Methode, in der anfangs 2,5-Dibrompyridin in 2-Iod-5-brompyridin überführt wird und anschließend eine palladiumkatalysierte Carbonylierung zum benzylgeschützten korrespondierenden Carboxylat führt. Schließlich wurde in einer zinkvermittelten Kreuzkupplung alkyliert und die Schutzgruppe entfernt.^[124]

In der geplanten Synthese sollten die bisher erfolgreich durchgeführten Alkylierungen mit der eisenkatalysierten Kreuzkupplung nach FÜRSTNER und LEITNER mit eingebaut werden. Da jedoch Arylbromide und -iodide zumeist die Reduktionsprodukte lieferten und nur Arylchloride zu den erwünschten Kreuzkupplungsprodukten führten^[87], ging der erste Syntheseansatz von 2,5-Dichlorpyridin (**148**) aus, das im ersten Schritt in 2-Position in Gegenwart von Acetylchlorid iodiert wurde^[125,126] (Schema 11A). Die Verbindung **149** wurde dabei lediglich mit 21 % Ausbeute erhalten (Literaturangabe 85%). Es folgte eine palladiumkatalysierte Carbonylierung mit Benzylalkohol zum Ester **150** mit 83 % Ausbeute. Nun sollte Verbindung **150** über eine Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER alkyliert werden, wobei auch in mehreren Ansätzen das erwünschte Kreuzkupplungsprodukt **151** nicht erhalten werden konnte.

Demnach wurde die Syntheseroute umgestellt und startete mit der Monoalkylierung von **148** (Schema 11B). Es wurden die Kreuzkupplungsprodukte **152a** und **152b** mit 68 % Ausbeute in einem säulenchromatographisch nicht trennbarem Regioisomerengemisch erhalten (Regioisomerenverhältnis **152a:152b**: 1.8:1). Schließlich sollte eine Iodierung des Gemischs erfolgen, die **153** als Produkt beinhaltet hätte. Doch konnte auch hier in mehreren Versuchen keine Produktbildung verzeichnet werden.

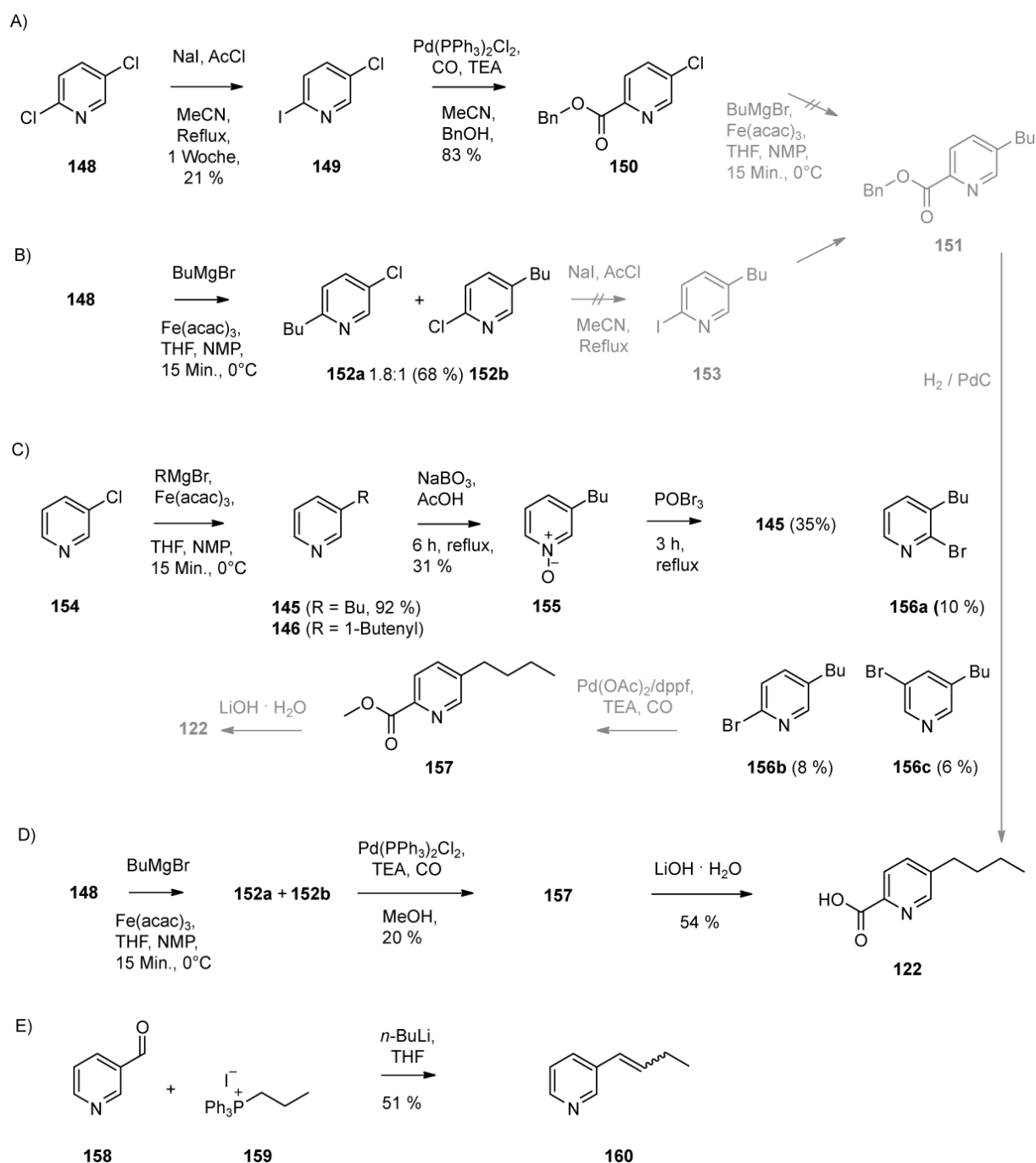
Zur Darstellung von Fusarinsäure zeigten SONG et al., dass auch 2,5-Dibrompyridin als Templat zur Bildung von 5-Brompyridin-2-methylcarboxylat eingesetzt werden kann, wobei bei Einsatz des Dihalogenids eine Bildung des Diesters nicht zu vermeiden war.^[124] Um die Diesterbildung zu umgehen, sollte das Monobromid **156b** dargestellt werden, um es als Templat zur Carbonylierung einzusetzen. In diesem Ansatz (Schema 11C) wurde im ersten Schritt 3-Chlorpyridin (**154**) alkyliert, was beim Einsatz von Butylmagnesiumbromid 3-Butylpyridin (**145**) in sehr guten Ausbeuten lieferte. Da nach der Methode von OHTA et al. Pyrazine bereits erfolgreich in ihre N-Oxide überführt wurden^[91], sollte dies auch hier

Anwendung finden und das Pyridin-*N*-oxid (**155**) konnte mit 31 % Ausbeute erhalten werden. Die folgende Behandlung von **155** mit POBr₃ lieferte einerseits das Reduktionsprodukt **145** sowie eine Mischung der Regioisomere **156a-156c**, wobei das gewünschte Regioisomer **156c** mit nur 8 % Ausbeute erhalten werden konnte. Im Weiteren sollte **156c** in einer palladiumkatalysierten Carbonylierung in den Methylester (**157**) umgesetzt und schließlich durch Verseifung zum gewünschten Produkt **122** führen. Da die vorherige Bromierung jedoch 35 % der Verbindung **145** lieferte, die zwei Stufen zuvor eingesetzt worden war und zusätzlich ein Regioisomerengemisch der monobromierten Butylpyridine entstand, wurde die Weiterverarbeitung schließlich verworfen.

Im letzten Syntheseansatz zu **122** (vgl. Schema 11D) wurde anfangs **148** alkyliert und lieferte wieder das Regioisomerengemisch **152a** und **152b**, das danach zu Fusarinsäuremethylester (**157**) carbonyliert wurde.^[127,128] Nach Verseifung von **157** wurde das gewünschte Produkt **122** mit 54 % Ausbeute erhalten. Es konnte schließlich eine noch kürzere Syntheseroute zu **122** entwickelt werden, die zudem eine Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER beinhaltet.

Die Synthese des Decarboxylierungsprodukts von **122** konnte durch einfache Kreuzkupplung von 3-Chlorpyridin (**151**) mit Butylmagnesiumbromid in 92 % Ausbeute erhalten werden (Schema 11C). Ein Vergleich der Retentionindices sowie Massenspektren der synthetisierten Substanzen **145** und **122** mit den Verbindungen des EtOAc Extrakts von *Fusarium fujikuroi* zeigte, dass es sich um Fusarinsäure und 3-Butylpyridin handelt.

Im Weiteren wurde eine Synthese der möglichen Alkenylpyridine durchgeführt. Die Darstellung von 3-But-1-en-pyridin (**160**) startete mit der WITTIG Reaktion von Pyridin-3-aldehyd (**158**) mit zuvor synthetisiertem Propyltriphenylphosphoniumiodid (**159**) und **160** wurde in einem *cis/trans*-Isomeren Gemisch mit 51 % Ausbeute erhalten (vgl. Schema 11E). Der Vergleich der Massenspektren von **160** mit dem Naturstoff **146** zeigte, dass es sich dabei nicht um Verbindung **160** handeln kann. Anschließend wurde wiederum eine Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER ausgehend von **154** mit But-3-en-magnesiumbromid durchgeführt, die auch nach mehrmaliger chromatographischer Aufreinigung kein vollständig sauberes Produkt **146** lieferte.



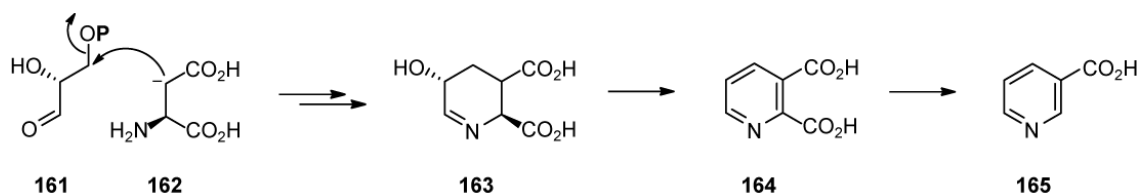
Schema 11: Syntheserouten zu den Pyridinderivaten.

Die GC-MS Analyse des Produktgemischs und Vergleich der Retentionsindices sowie Massenspektren zeigte jedoch, dass es sich bei dem Hauptpeak um die gesuchte Verbindung des EtOAc-Extrakts von *Fusarium fujikuroi* handelt, wobei die vollständige Identifizierung des Homoallylpyridins (**146**) ohne weitere Strukturaufklärung nur tendenziell verbleibt. Dadurch dass eine Kreuzkupplungsreaktion mit dem Homoallylgrignardreagenz nur zu

unbefriedigenden Ergebnissen führte, bleibt die Synthese zu Dehydrofusarinsäure (**147**) offen und es kann die Anwesenheit dieser Verbindung im Extrakt nur vermutet werden.

3.3 Biosynthese der Pyridinderivate

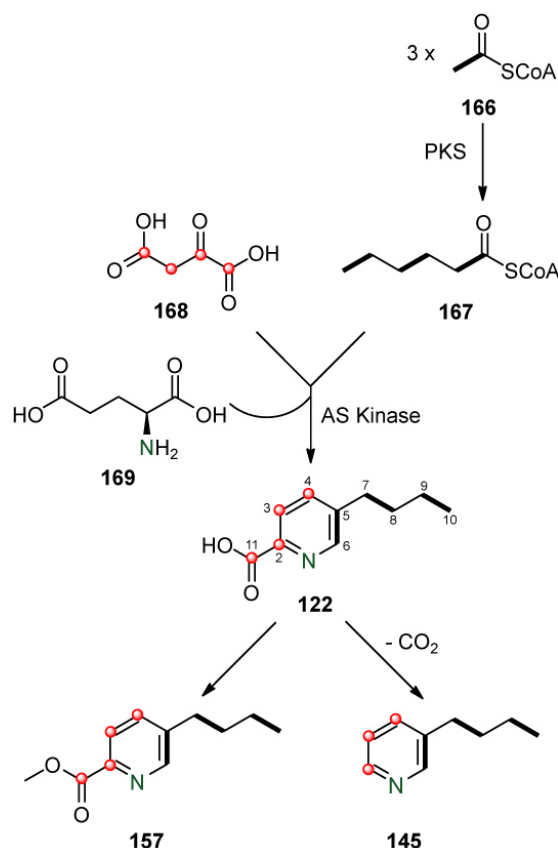
Eine Überlegung zur Biosynthese der Pyridinderivate liefert der Nicotinsäureweg in Pflanzen zu Nicotinsäure (**165**) (Schema 12). Diese startet mit einem nucleophilen Angriff von *L*-Aspartat (**162**) an 3-Phosphoglycerinaldehyd (**161**). Die Ringschlussbildung des Imins **163** wird durch Ausbildung einer Schiffschen Base und anschließender Wasserabspaltung erreicht. Durch Dehydratisierung und Dehydrierung wird Chinolinsäure (**164**) ausgebildet, die nach Decarboxylierung **165** liefert.^[129]



Schema 12: Nicotinsäurebiosynthese in Pflanzen.

Eine denkbare Decarboxylierung von **164** in Position 3 anstatt Position 2, würde das Grundgerüst der Fusarinsäure mit einer Carboxylfunktion in der richtigen Position liefern. Die Alkylseitenkette könnte durch ein PKS Modul in das Molekül eingeführt werden. Ein möglicher Einbau von 3-Phosphoglycerinaldehyd in den Pyridinring, wurde durch einen Zusatz von [1,1,2,3,3-²H₅]Glycerol zu dem Medium getestet. Der Pilz wurde nach Inkubation nach dem bereits erwähnten Verfahren extrahiert und die erhaltene Lösung mittels GC-MS analysiert. Es zeigte sich, dass der C3-Baustein in keinem der Pyridinderivate eingebaut war und Glycerol somit als Basis für einen Teil des Pyridinrings ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin wurde der Einbau von Acetat durch Zusatz von [2-¹³C]Acetat zum Medium geprüft. *Fusarium fujikuroi* produzierte bei diesem Experiment keine Fusarinsäure sowie Dehydrofusarinsäure und nur wenig des Homoallylpyridins. Zur Abschätzung der Einbaurate

wurde demnach 3-Butylpyridin herangezogen, wo festgestellt werden konnte, dass 5,8 % des markierten Acetats in das Molekül eingebaut wurde. Die Einbaurate ist zwar gering, doch ist das Ergebnis konsistent mit bereits publizierten Daten, die mit *Fusarium oxysporum* erhalten wurden.^[105] Dort wurden [1,2-¹³C₂]Acetat und ¹³C- und ¹⁵N-markiertes Aspartat dem Pilz zugesetzt und mittels NMR-spektroskopischer Methoden die Einbauraten der verfütterten vermuteten Vorläufer berechnet.



Schema 13: Vermutliche Biosynthese von **122**, **145** und **157** nach BROWN et al. und STIPANOVIC et al.; (AS = Aminosäure).

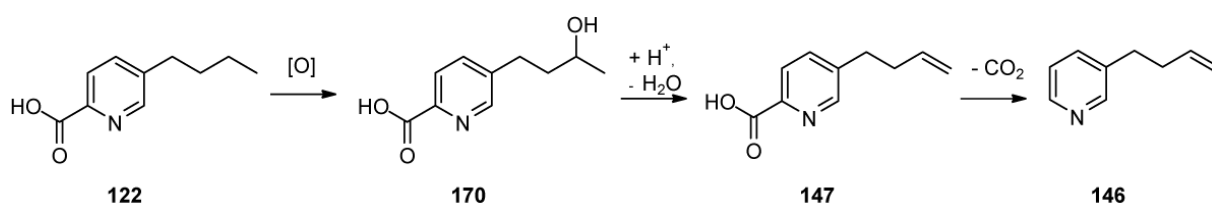
Es stellte sich heraus, dass Acetat verstoffwechselt wurde und in **122** an den Positionen C5-6, C7-8 und C9-10 eingebaut war (Schema 13). Der Nachweis, dass der Stickstoff in **122** einer Aspartatquelle entstammt, konnte nicht erbracht werden. Jedoch zeigte sich, dass die ¹³C-Markierungen des Aspartatvorläufers im Molekül **122** wieder zu finden waren, was ein Hinweis auf eine vorherige Transaminierung von Aspartat zu Oxalacetat gewertet wurde. In einem weiteren Experiment wurde zur Auffindung der Stickstoffquelle ¹⁵N-Glutamin verfüttert, was zu signifikant höheren Einbauraten führte. Als Ergebnis wurde festgehalten,

dass zwar Aspartat in Fusarinsäure eingebaut wird, vorher aber eine Transaminierung stattfindet und Oxalacetat als Lieferant für das Kohlenstoffgerüst dient.^[105] BROWN et al. fanden heraus, dass in *Fusarium verticillioides* ein Fusarinsäure Biosynthesegencluster existiert. Es wurden Coexpressionen von Genen durchgeführt, die für eine Polyketidsynthase (PKS) codieren und Inaktivierungsexperimente dieses Gens zeigten, dass keine Fusarinsäure mehr gebildet wurde. STIPANOVIC et al. schlug eine Biosynthese, die die Verknüpfung eines PKS-System mit einer Aminosäure vorsah, was durch eine Kombination aus nicht-ribosomaler Peptidsynthetase (NRPS) und PKS verwirklicht würde. Ein PKS-NRPS Modul, konnte von BROWN et al. jedoch im Biosynthesegencluster nicht nachgewiesen werden. Es wird demnach vermutet, dass eine Aspartokinase, dessen Gen mit dem PKS codierenden Gen coexprimiert wurde, mit in der Biosynthese von **122** involviert.^[130]

Ein Vorschlag für eine Biosynthese von **122**, **145** und **157** ist in Schema 13 wiedergegeben. Das PKS-Modul verknüpft 3 Acetateinheiten (**166**) zu dem Triketid (**167**). Oxalacetat (**168**) wurde vorgeschlagen als Kohlenstoffgerüst C2-4 und C11, wobei Glutamin als Stickstoffquelle dienen soll. Die Kondensation dieser drei Einheiten würde Fusarinsäure ausbilden, die in weiteren Schritten entweder methyliert wird und in das toxischere Methylfusarat (**157**) mündet oder unter Decarboxylierung **145** ausbilden würde, was die Anwesenheit in dem untersuchten Extrakt von *Fusarium fujikuroi* erklären würde.^[105]

Eine thermische Decarboxylierung im Injektor der GC-Einheit kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da nach Injektion der synthetisierten Referenz **122** nach Peakintegration 8 % **145** über thermischen Zerfall detektiert wurde, was im Gegensatz zu bereits publizierten Daten steht.^[131] Der Totalionenstrom des EtOAc-Extrakts von *F. fujikuroi* zeigt nach Integration mehr als 30 % des Pyridins **145**, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass neben der nachgewiesenen thermischen Decarboxylierung im Injektor der Pilz **145** nach Biosynthese zur Verfügung stellt.

Die nachgewiesenen Homoallylpyridine **146** und **147** könnten biosynthetisch im ersten Schritt durch Hydroxylierung von **122** in Position C9 Fusarinolsäure (**170**) ausbilden, die bereits in *F. fujikuroi* nachgewiesen werden konnte.^[132] Anschließende Eliminierung von Wasser würde die endständige Doppelbindung einführen und damit **147** entstehen lassen. Eine Decarboxylierung von **147** würde **146** als Homoallylpyridin hervorbringen (Schema 14).



Schema 14: Mögliche Biosynthese der nachgewiesenen Verbindungen **146** und **147** ausgehend von **122**.

4. Zusammenfassung Pyridine aus *F. fujikuroi*

Die Flüssigextraktion von *Fusarium fujikuroi* zeigte nach GC-MS-Analyse verschiedene Pyridinderivate, von denen Fusarinsäure **122** nach Datenbankvergleich identifiziert werden konnte. Die Strukturen von **145**, **146** und **147** wurden aus den Massenspektren abgeleitet. Eine neue Syntheseroute zu **122** wurde entwickelt, die mit einer eisenkatalysierten Kreuzkupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER ausgehend von 2,5-Dichlorpyridin die Regioisomere **152a** und **152b** lieferte. Anschließende Carbonylierung brachte den Fusarinsäuremethylester hervor, der nach Verseifung **122** als Produkt lieferte. Das Decarboxylierungsprodukt **145** konnte ebenfalls durch Kreuzkupplung von Chlorpyridin erhalten werden. Das Homoallylpyridin **146** verbleibt nur als tendenziell identifiziert. Die Fütterung von [2-¹³C]Acetat lieferte eine Einbaurate in **145** von 5,8 % und bestätigt somit bereits publizierte Analysen, die mittels NMR-Analysen nach Fütterung markierter Vorläufer erhalten wurden.^[105]

IV. α -Pyrone aus *Trichoderma*

1. *Trichoderma* sp.

Die filamentösen Schimmelpilze der Gattung *Trichoderma* (Abbildung 16) sind weltweit verbreitet. Sie kolonisieren cellulosebasiertes Material und sind in der Erde, an Wurzeln und Blattsystemen von Pflanzen zu finden.^[133] *Trichoderma* hat im Konkurrenzkampf um Nährstoffe, Licht und Raum in Abhängigkeit der Umweltbedingungen verschiedene Überlebens- und Abwehrmechanismen entwickelt. Die Besiedelung einer Pflanze mit *Trichoderma* wirkt sich förderlich auf die Bekämpfung phytopathogener Organismen wie *Fusarium* oder *Verticillium* u. a. aus, sodass verschiedene *Trichoderma* Stämme als Biozide in der Landwirtschaft Anwendung finden und mittlerweile kommerziell erhältlich sind. Ein Mechanismus zur Bekämpfung der Pflanzenpathogene ist der Mycoparasitismus, bei dem *Trichoderma* die Absonderung chitinolytischer oder glucanolytischer Enzyme herbeiführt und somit vermutlich die Zellwand des Parasiten abbaut.^[134–137] Ein weiterer Abwehrmechanismus zur Arterhaltung bzw. zur Erhaltung seines Wirtes, ist die Produktion von mitunter antibiotisch wirksamen Sekundärmetaboliten. Dabei dienen die freigesetzten Verbindungen z.B. der Pflanze einen eigenen Antagonismus gegen den Parasiten zu entwickeln und haben eine indirekte Wirkung oder die Sekundärmetabolite richten sich direkt durch verschiedene Wirksamkeiten gegen den Feind.^[138]

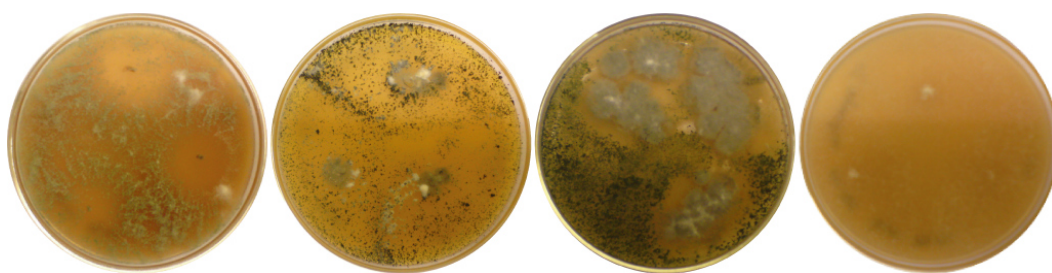


Abbildung 16: Agarplattenkulturen von *Trichoderma* sp.

Das Diketopiperazin Gliotoxin (**171**) (vgl. Abbildung 17) beispielsweise ist ein bekanntes Mykotoxin produziert von *Aspergillus fumigatus*. Daneben wurde **171** auch aus *T. viride* sowie *T. hamatum* isoliert und besitzt antivirale, antibakterielle, cytotoxische und immunsuppressive Eigenschaften. *Trichoderma* Stämme, die **171** produzieren sind zudem antagonistisch gegen *R. solani*.^[138]

Beachtliche Aktivität gegen *R. solani* zeigte auch das aus *T. harzianum* T22 isolierte T22azaphilon (**172**). Dieser *Trichoderma* Stamm ist wegen der Produktion von zellwandabbauenden Enzymen bekannt und findet als Biopestizid gegen Phytopathogene Anwendung, wobei der komplexe antagonistische Wirkmechanismus noch nicht abschließend geklärt wurde. Aufgrund von Biotests mit *R. solani* und der Identifizierung von **172** als antibiotisch wirksamster Sekundärmetabolit, ausgehend von *T. harzianum* T22 während der Wachstumsphase, wurde auf einen Synergismus des Sekundärmetabolits mit den zellwandabbauenden Enzymen als möglicher antagonistischer Mechanismus geschlossen.^[139]

Auch pharmakologisch wirksame Substanzen konnten aus *Trichoderma* Stämmen gewonnen werden. Als Statine werden Arzneistoffe bezeichnet, die die HMG-CoA-Reduktase inhibieren und somit die Cholesterinbiosynthese hemmen.^[140] Ihren Ursprung haben Statine als Sekundärmetaboliten aus Pilzen. Mevastatin (Compactin) (**173**) wurde erstmals in den 1970ern aus *Penicillium brevicompactum* und *P. citrinum* isoliert.^[138,140] Später stellten sich *T. longibrachiatum* und *T. pseudokonigii* ebenfalls als Produzenten des heute vermarkteten Cholesterin-senkenden Arzneimittel **173** heraus.^[141]

Neben den nicht-flüchtigen Sekundärmetaboliten von *Trichoderma* mit vielfältigen Eigenschaften und Anwendungen^[138], sind auch flüchtige Stoffwechselprodukte untersucht worden die z.B. als Bouquet ausgehend von *T. harzianum* und *T. polysporum* den Holzzerstörer *Lentinus lepideus* (Sägeblättling) lysieren und inhibieren.^[142] Unter den flüchtigen Metaboliten finden sich unterschiedliche Substanzklassen wie Lactone, Alkohole, Terpene, Ketone und Pyrone wie Gasraumanalysen mittels Festphasenmikroextraktion von *T. atroviride* zeigten.^[143] Die spirozyklischen Sesquiterpene *tricho*-Acorenol (**174**) und Acorenol (**175**) wurden erstmals aus *Trichoderma koningii* identifiziert.^[144] Darüber hinaus stellten sich *T. viride*, *T. harzianum* sowie *T. longibrachiatum* als Produzenten von **174** und **175** heraus, dessen Biosynthese anhand von Fütterungsexperimenten mit unterschiedlich Deuterium markierten Mevalolacton Isotopomeren als Vorläufer aufgeklärt werden konnte.^[145,146] Als Schlüsselaromastoff im Milchfett bzw. der Butter ist das süßlich schmeckende flüchtige δ -Decanolacton (6-Pentyltetrahydropyran-2-on) (**176**) bekannt.^[147] Aus *Trichoderma* Extrakten wurde ebenfalls **176** und ferner Massoialacton (**177**) als flüchtige Komponenten identifiziert. Es zeigte sich, dass die beiden Lactone **176** und **177** wachstumshemmende Eigenschaften gegenüber *C. albicans* und *A. niger* sowie des Influenza Virus A aufweisen.^[138,148]

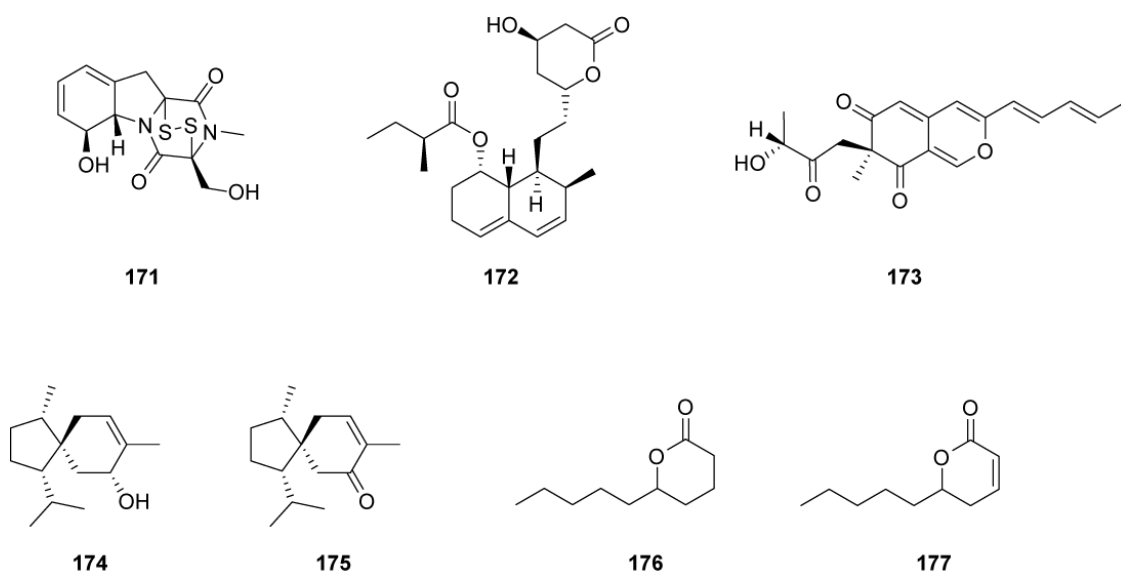


Abbildung 17: Sekundärmetabolite von *Trichoderma* sp..

2. α -Pyrone (2*H*-Pyran-2-one)

Die Grundstruktur der α -Pyrone (178) (Abbildung 18) besteht aus einem sechsgliedrigen Heterozyklus mit einem Sauerstoffatom im Ring. Bakterien, Insekten, Tiere sowie Pflanzen produzieren diesen zyklischen ungesättigten Ester. Die Wirkung der Substanzen ist unterschiedlich und reicht von Mechanismen zur Abwehr gegen andere Organismen hin zu Schlüsselsubstanzen für andere biologisch relevante Intermediate.^[149] Sogar medizinische Wirksamkeiten wie Antitumoraktivitäten^[150,151] oder HIV Protease-hemmende^[152,153] Eigenschaften konnten den α -Pyrone basierenden Naturstoffen nachgewiesen werden.

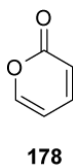


Abbildung 18: Grundgerüst des α -Pyrone.

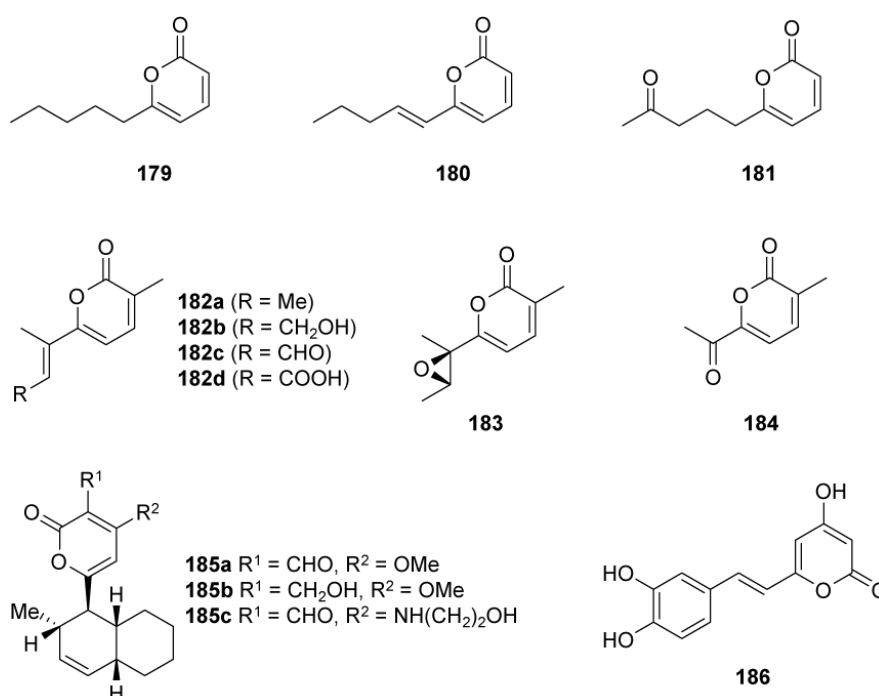


Abbildung 19: Pyrone als Sekundärmetabolite.

Unter den Naturstoffen mit einem α -Pyrone Motiv (Abbildung 19) herrscht strukturell große Vielfalt und es wird in verschiedene Klassen eingeteilt. Die Klasse der 6-Alkyl-2*H*-pyranone besitzt einen kokosartigen Geruch^[154] und trägt zum Aroma in Früchten wie Pfirsichen^[155] und Nektarinen (*Prunus persica*)^[156,157] bei. Ein repräsentativer Vertreter, der erstmals aus *Trichoderma* extrahiert wurde, ist 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on (**179**)^[158], das antifungale und in hohen Konzentrationen phytotoxische Aktivität zeigte.^[159] Eine wachstumshemmende Wirkung von **179** wurde u. a. auf *Phomopsis sclerotioides*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia cerealis*, *Botrytis cinerea*, sowie *Sclerotinia sclerotiorum* nachgewiesen.^[159] Die Behandlung von geernteten Kiwis mit **179** z.B. wirkte dem Befall mit dem Schädling *B. cinerea* während der Lagerung stark entgegen.^[160] Ein weiterer Vertreter dieser Klasse konnte aus *T. viride* neben **179** isoliert werden. Dabei handelte es sich um das Isomer (*E*)-6-(Pent-1-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**180**).^[159,161] Außerdem konnte **180** als Bestandteil des Königinpheromons der roten Feuerameise *Solenopsis invicta* und im Sekret der männlichen Kieferspeicheldrüse der Ameise der Gattung *Componotus* nachgewiesen werden.^[162,163] *T. viride* lieferte weiterhin das oxigenierte α -Pyrone 6-(4-Oxopent-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**181**), das ebenfalls inhibitorische Eigenschaften gegenüber *Sclerotinia* aufweist.^[164]

Gibepyrone sind eine Gruppe von 6-Alkenyl-pyranonen und wurden als Metabolite von *Gibberella fujikuroi* identifiziert.^[102,165] Sie werden eingeteilt in Gibepyrone A-F (**182-184**)

und zeigen antimikrobielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*.^[165]

Andererseits trifft man die α -Pyron-Einheit auch in Toxinen an. Aus *Alternaria solani*, dem Erreger der Dürffleckenkrankheit an Nachtschattengewächsen wie Kartoffeln und Tomaten, konnten die Solanopyrone A-C (**185a-c**) isoliert werden. Solanopyron A induziert in einer Konzentration von 1 g L^{-1} nekrotische Läsionen an den Blättern der Kartoffelpflanze.^[166]

Styryl-2-pyranone sind aus Pflanzen der Gattungen *Piper*, *Aniba*, *Milius*, *Ranunculus* u. a. bekannt.^[167] Auch Pilze wie *Polyporus hispidus*, *Polyporus schweinitzii* und *Gymnopillus* produzieren Styryl-2-pyranone wie Hispidin (**186**)^[168,169], das beträchtliche antioxidative, antikanzerogene, antidiabetische und Protein C-Kinase hemmende Eigenschaften besitzt.^[170] Desweiteren konnte **186** als Präventivmaßnahme eingesetzt werden, um durch Peroxynitrit verursachte DNA-Schäden vorzubeugen.^[170]

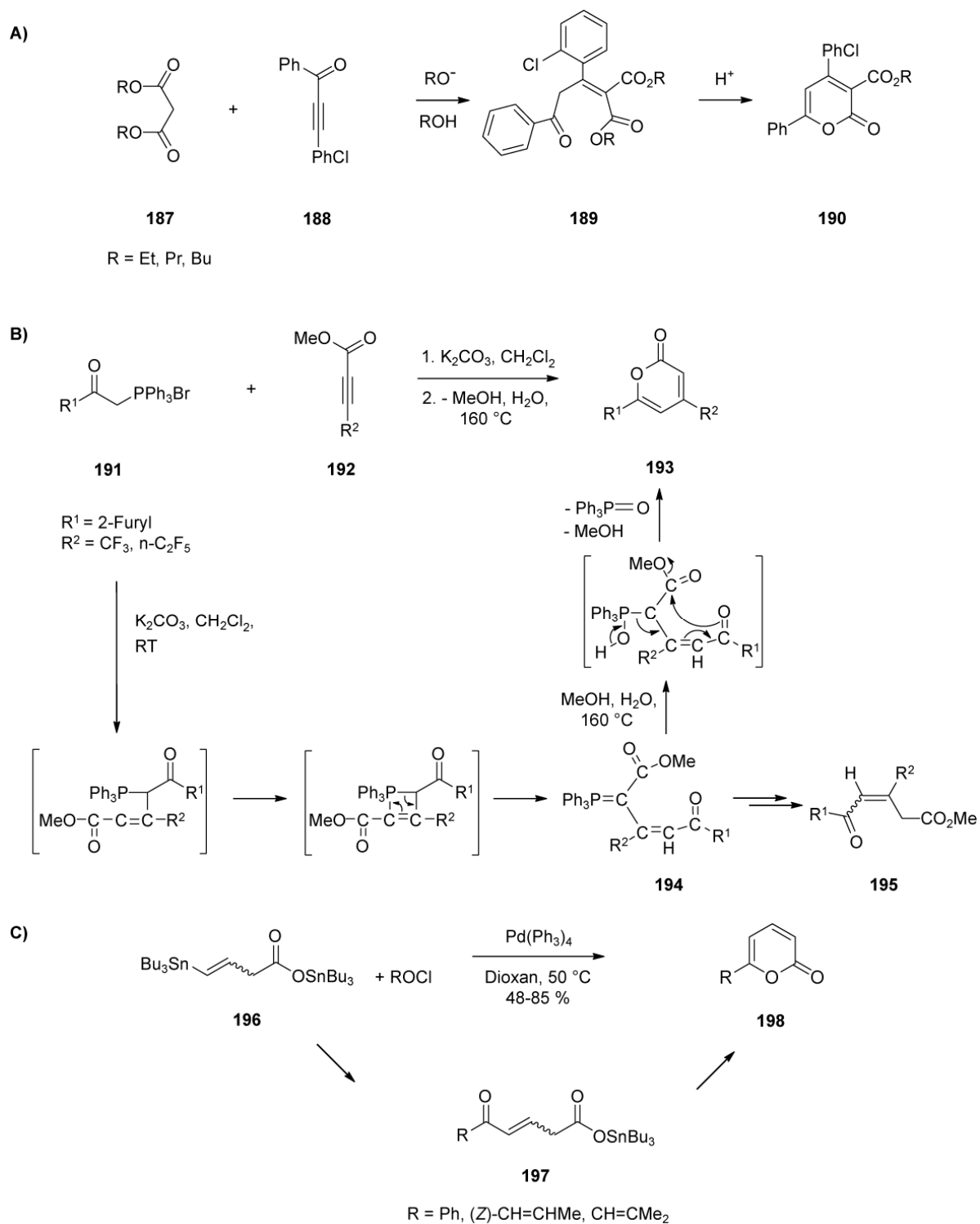
2.1 Synthese von α -Pyronen

Der Ringschluss zu der α -Pyroneinheit wird häufig durch Zyklisierung von 5-Oxosäurederivaten erreicht, die entweder isoliert vorliegen oder *in situ* erzeugt werden. Diese Systeme werden über drei verschiedene Ansätze zugänglich gemacht:

- a) über Esterenolate,
- b) über Ketonenolate,
- c) durch Acylierung von Esterdienolaten.^[167]

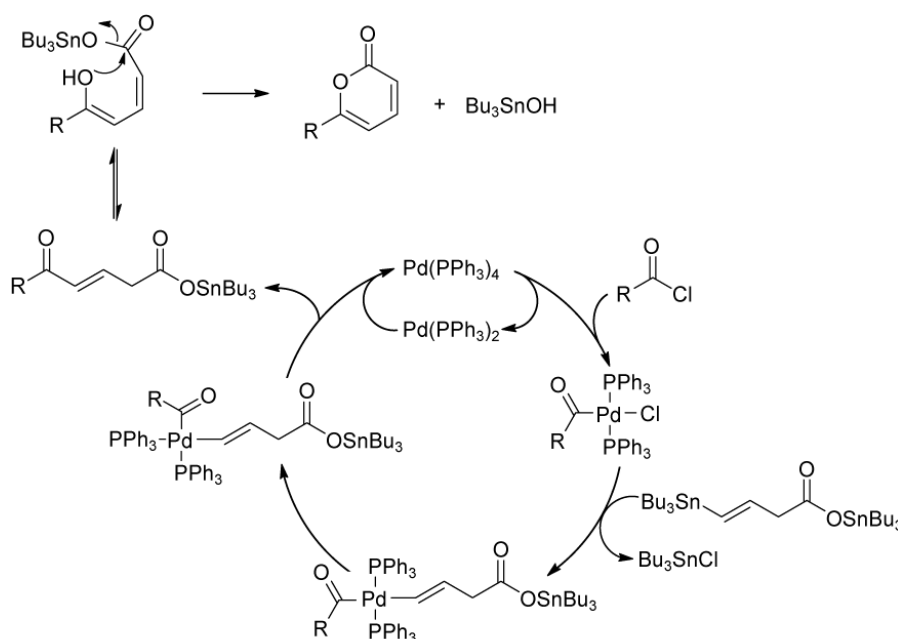
Ansatz a) wird über die Verwendung von Malonaten oder β -Ketoestern verfolgt. Es konnten z. B. die Dialkylmalonate (**187**) mit dem α,β -ungesättigten Keton **188** erfolgreich zu dem 5-Ketoester **189** umgesetzt werden, der anschließend säurekatalysiert zu Pyron **190** zyklisiert wurde (Schema 15A).^[171] Eine andere Möglichkeit das Pyrongerüst aufzubauen, wurde mit der Reaktion des Triphenylphosphoniumbromids **191** mit dem Alkinoat **192** durchgeführt und liefert somit eine Methode über den Weg b). Im ersten Schritt erfolgte eine Art MICHAEL Addition, wodurch bei Raumtemperatur das thermodynamische bevorzugte Produkt **194** gebildet wurde. Die dabei entstandene 1,5-Dicarbonylverbindung wurde durch Hydrolyse in heißem wässrigem Methanol in das Pyron **193** und das *E/Z*-Isomerenpaar des Esters (**195**) überführt (Schema 15B).^[172] Der notwendige 5-Ketoester **197** kann auch durch

C-C-Kupplung des Stannans **196** mit einem Säurechlorid erreicht werden (Schema 15C). Die Palladium-katalysierte STILLE Kupplung gestattet die *in situ* Transformation zu dem korrespondierenden Pyron **198**.^[173]



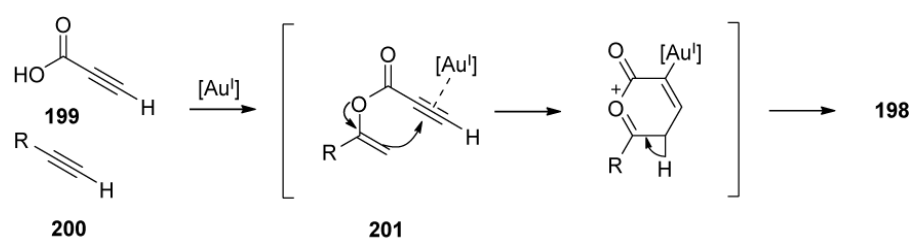
Schema 15: Verschiedene Syntheserouten zu α -Pyrone.

Mechanistisch ist die STILLE Kupplung in vier Schritte eingeteilt (Schema 16). Der erste Schritt setzt mit der oxidativen Addition eines Säurechlorids an Pd(0) ein. Danach findet Transmetallierung des Zinnorganyls statt. In den letzten beiden Schritten tritt *cis-trans*-Isomerisierung ein und durch reduktive Eliminierung wird der 5-Ketoester aus dem Katalysezyklus entlassen.^[173,174] In der Dienolform lactonisiert der 5-Ketoesters unter Abspaltung von Tributylzinnhydroxid zum gewünschten α -Pyrone.



Schema 16: Katalysezyklus nach J. K. STILLE.

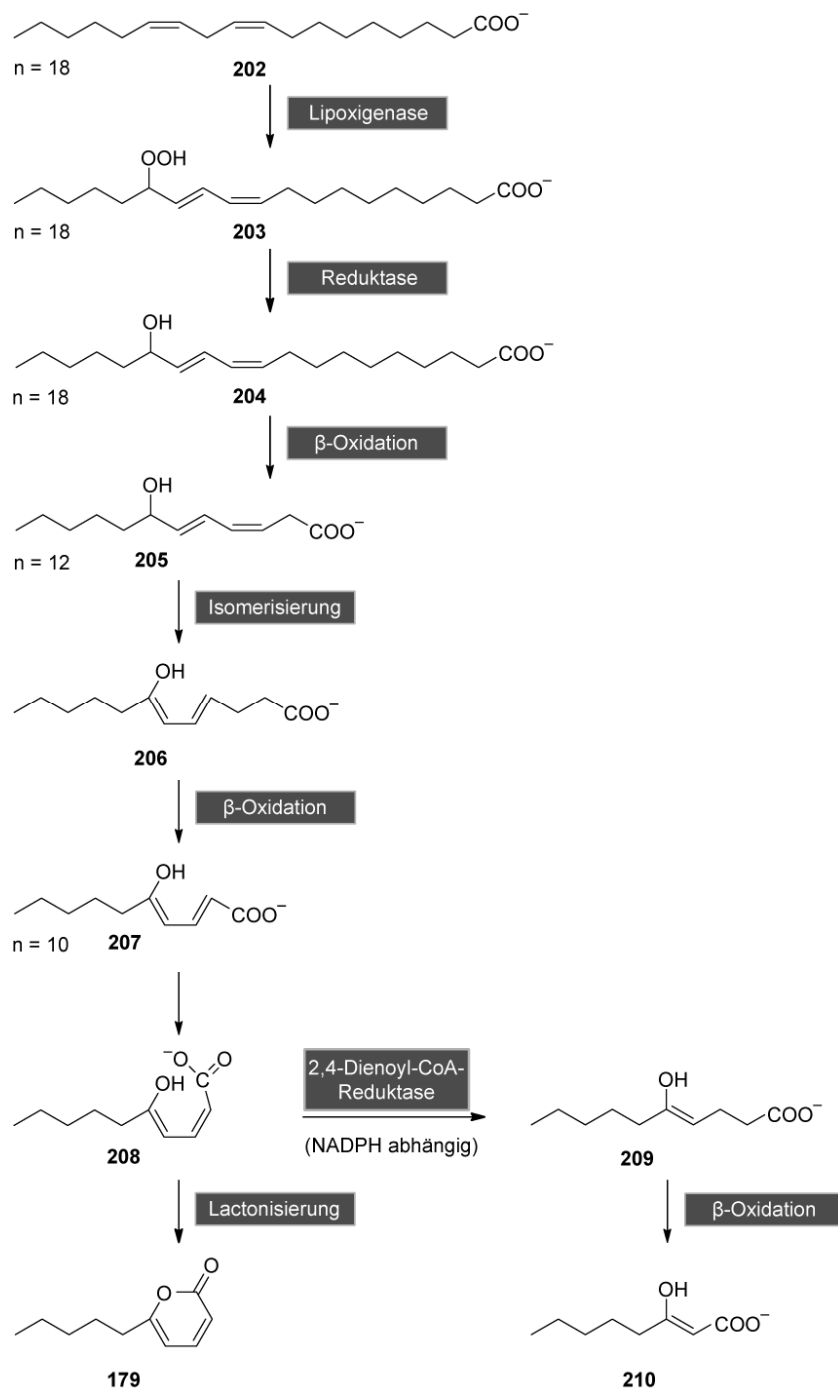
Eine neuere effiziente Methode zur Zyklisierung zu der α -Pyrone Einheit wurde mittels Goldkatalyse aus Propiolsäure (**199**) und einem terminalen Alkin (**200**) durchgeführt.^[175] Der vermutete Mechanismus der Reaktion führt im ersten Schritt zum Vinylpropiolat **201** durch nucleophile Addition von **199** an **200** (Schema 17). Der Gold(I)-Katalysator dient dabei der Funktionalisierung der C-C-Dreifachbindung wodurch die Elektrophilie des Alkins erhöht wird.^[175,176] Das Intermediat **201** geht anschließend eine 6-*endo-dig*-Zyklisierung ein, was wiederum durch Anlagerung des Goldkatalysators an die C-C-Dreifachbindung initiiert wird. Nach Deprotonierung und Demetallierung wird schließlich aus dem Oxocarbeniumion das α -Pyrone **198** ausgebildet.^[175,176]



Schema 17: Synthesemechanismus zu α -Pyrone über eine Gold(I) katalysierte Kaskadenreaktion.

2.2 Biosynthese von Pyronen

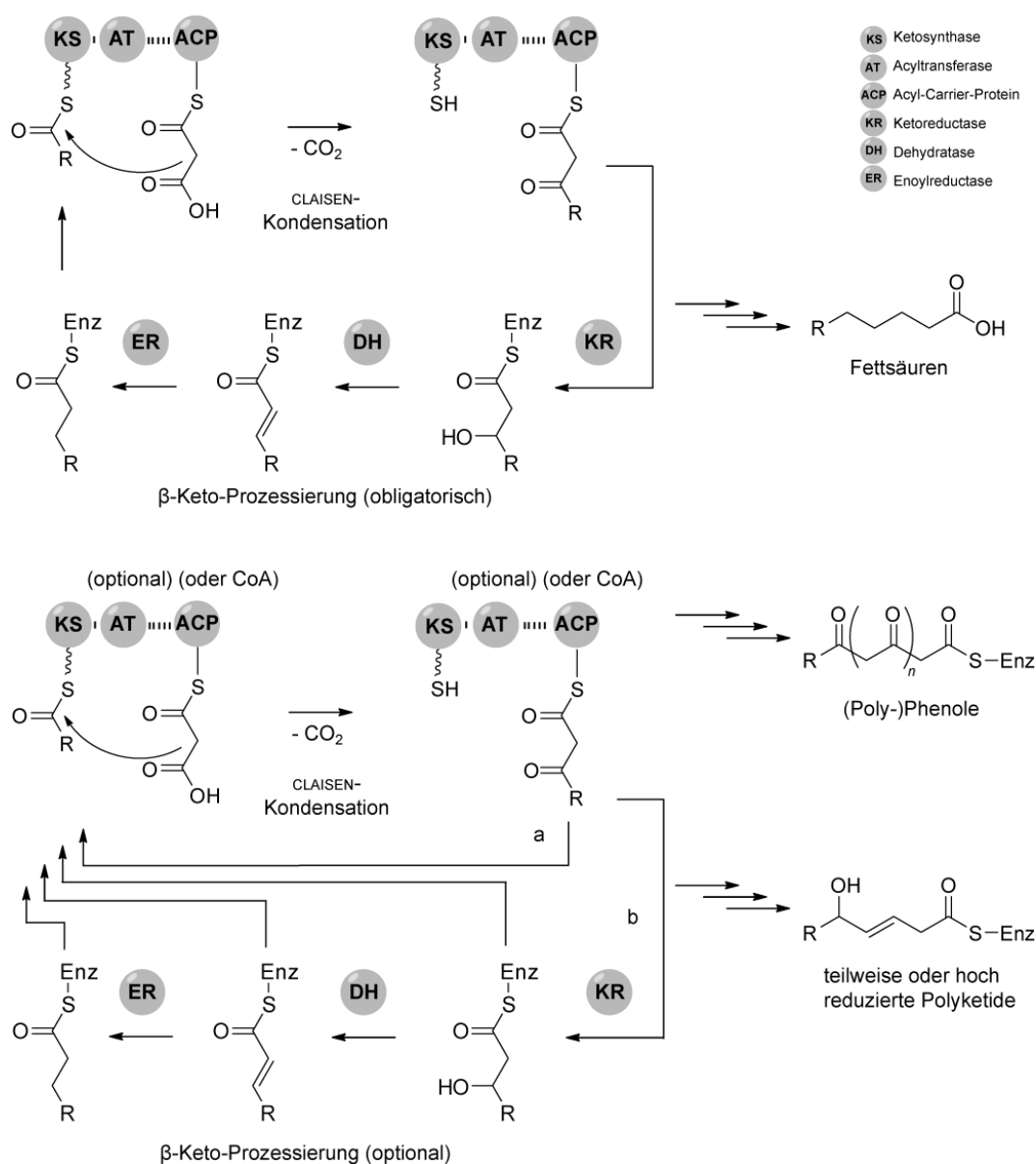
Für die Biosynthese zu der α -Pyroneinheit sind verschiedene Wege vorgeschlagen worden. Mechanistisch kann die Pyroneinheit einerseits aus dem Fettsäureabbau und anschließender Lactonisierung entstehen und andererseits aus einem Hybrid zwischen Fettsäurebiosynthese und Polyketidsynthese.



Schema 18: Biosynthese zu **179** durch Abbau von Linolsäure.

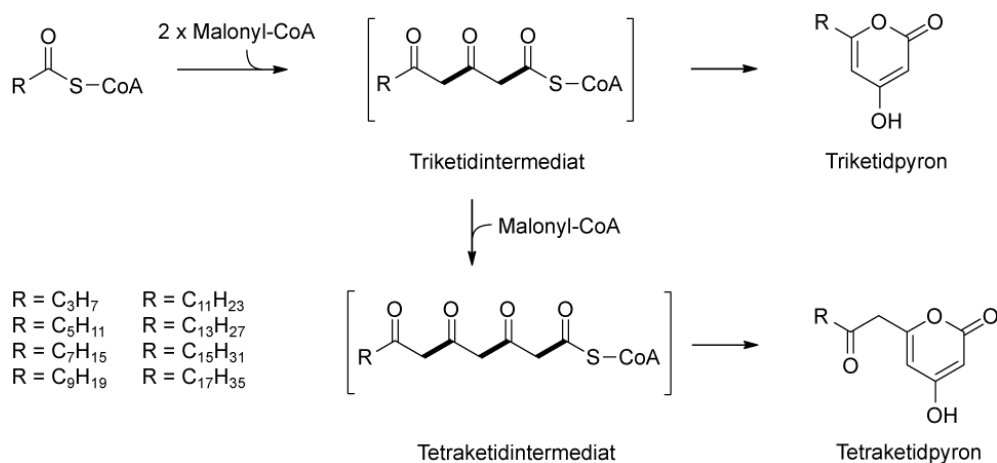
Ein Experiment zum Nachweis der Biosynthese zu **179** wurde durch Fütterungsexperimente mit [U-¹⁴C]Linolsäure sowie [5-¹⁴C]Natriummevalonat zu *T. viride* und *T. harzianum* durchgeführt, wobei davon ausgegangen wurde, dass **179** entweder aus dem Fettsäuremetabolismus oder durch Aufbau aus Mevalonat über einen Abzweig zu Acetat resultiert.^[177] Nach Vergleich der Einbauraten von [U-¹⁴C]Linolsäure und [5-¹⁴C]Natriummevalonat in **179** zeigte sich, dass 18-fach mehr [U-¹⁴C]Linolsäure als [5-¹⁴C]Natriummevalonat verstoffwechselt wurde. In einem weiteren Fütterungsexperiment mit [1-¹⁴C]Linolsäure hingegen konnte kein ¹⁴C-**179** nachgewiesen werden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der in Schema 18 gezeigte hypothetische Biosyntheseweg zu **179** postuliert. Dabei wird im ersten Schritt Linolsäure (**202**) in einer Lipoxigenase-katalysierten Reaktion zum Peroxid **203** umgewandelt. Eine Reduktase liefert die Hydroxylinsäure (**204**). Anschließend findet eine Kettenverkürzung von n = 18 auf n = 12 mittels β -Oxidation zu 7-Hydroxy-3,5-dodecensäure (**205**) statt. Isomerisierung der *trans*-Doppelbindung zur *cis*-Fettsäure **206** und weitere β -Oxidation zu **207** liefert nach Umlagerung das Intermediat **208**. Nach Lactonisierung von **208** resultiert schließlich das α -Pyrone **179** oder es wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion unter Katalyse einer 2,4-Dienoyl-Reduktase zu **209** reduziert, dass nach β -Oxidation zu 3-Hydroxy-2-octensäure (**210**) verkürzt wird.^[177]

Eine andere Möglichkeit die α -Pyroneinheit aufzubauen bietet die Biosynthese von Polyketiden mit Fettsäuren als alternativen Startern. Im Allgemeinen werden einfache Bausteine wie Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA zum Aufbau des Gerüsts verwendet (Schema 19). Als erster kettenverlängernder Schritt erfolgt eine CLAISEN-Kondensation unter Bildung von Acetoacetyl-ACP unter Beteiligung einer Ketosynthase (KS), Acyltransferase (AT) sowie eines Acyl-Carrier-Protein (ACP). In weiteren Modifizierungsschritten wird die β -Oxoeinheit bis zur Acyleinheit mittels der Ketoreduktase (KR), einer Dehydratase (DH) sowie einer Enoylreduktase (ER) umgesetzt. Während in der Biosynthese gesättigter Fettsäuren ein vollständig reduktiver Zyklus katalysiert wird, bietet die Polyketidsynthese einerseits durch die Verwendung unterschiedlicher Bausteine als Starter- sowie Verlängerungseinheiten und andererseits optionaler Reduktionsschritte, eine sehr große Produktvielfalt. Eine Einteilung der Polyketidsynthasen erfolgt nach drei verschiedenen Typen. Die modulare und iterative Typ I PKS, die iterative Typ II PKS und schließlich die iterative PKS des Typs III.^[178,179]

**Schema 19:** Fettsäurebiosynthese (oben) und Polyketidsynthese (unten).^[179]

Typ-III-PKS waren lange Zeit nur aus Pflanzen bekannt. Die prominentesten Beispiele sind Chalcon- und Stilbensynthasen, die Endprodukte wie Naringenin-chalcon liefern.^[179] Die Analyse der Produkte einer rekombinant exprimierten Polyketidsynthese aus indischem Bleiwurz (*Plumbago indica*) resultierte in der Identifizierung von Phenylpyronen sowie verschiedener 4-Hydroxy-2-pyrone. Heterologe Expression der PKSA und PKSB aus *Arabidopsis thaliana* und anschließende Inkubationsexperimente zeigten, dass Fettsäure-CoA-ester als Startereinheit akzeptiert wurden und Triketid- und Tetraketidpyrone lieferten.^[180] Auch bakterielle Typ-III-PKS besitzen eine erweiterte Substratspezifität. Das

Gen *ArsC* aus *Azotobacter vinelandii* zeigte nach Expression und Inkubation mit CoA-Estern gesättigter Fettsäuren eine breite Substratakzeptanz, sodass Fettsäuren mit Kettenlängen von C₂-C₂₂ von *ArsC* zu Alkylpyronen nach Kettenverlängerung umgesetzt wurden.^[181] Ebenso verhalten sich die PKS18 aus *Mycobacterium tuberculosis* und BpsA aus *Bacillus subtilis*, die Acyl-CoA-Substrate mit einer Länge von C₂-C₂₀ zu den Alkylpyronen als Produkte umsetzen.^[182,183] Ein ungewöhnlicheres Beispiel liefert die Typ-III-PKS aus *Streptomyces coelicolor*, die verzweigte Fettsäurestartereinheiten und Ethylmalonyl-CoA für die Verlängerung verwenden kann und α -Pyrone mit verzweigten Alkylseitenketten in der Produktpalette bereithält.^[184] Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Polyketidsynthasen des Typs III in Pilzen existieren, wie z.B. im roten Schimmelpilz *Neurospora crassa*, dessen Typ-III PKS aliphatische CoA-Thioester von 4-20 Kohlenstoffatomen akzeptiert, um sie zu den korrespondierenden Pyronen nach Verlängerung umzusetzen.^[185] Heterologe Expression des Gens *csyA* aus *Aspergillus oryzae* und Inkubation mit CoA-Fettsäureestern von C₃-C₁₇ als Startereinheiten resultierten in der Identifizierung von Triketid- sowie Tetraketidpyronen. Eine Auswahl der Produkte, sowie der mechanistische Verlauf ist in Schema 20 dargestellt.^[186]



Schema 20: Biosynthese von α -Pyronen via PKS:

3. Pyrone aus *Trichoderma asperellum* und *Trichoderma viride*

3.1 Flüchtige Duftstoffe aus *Trichoderma*

Die flüchtigen Duftstoffe ausgehend von *T. viride* und *T. asperellum* wurden mittels der CLSA-Methode gesammelt und die Extrakte mit GC-MS analysiert.^[37] Nach 6 Tagen (*T. viride*) und 4 Tagen (*T. asperellum*) Inkubation bei 28 °C und anschließender CLSA-Analyse konnten die in Abbildung 20 dargestellten Verbindungen mit den in Tabelle 2 angegebenen relativen Mengen identifiziert werden. Repräsentative Totalionenchromatogramme sind in Abbildung 21 wieder gegeben.

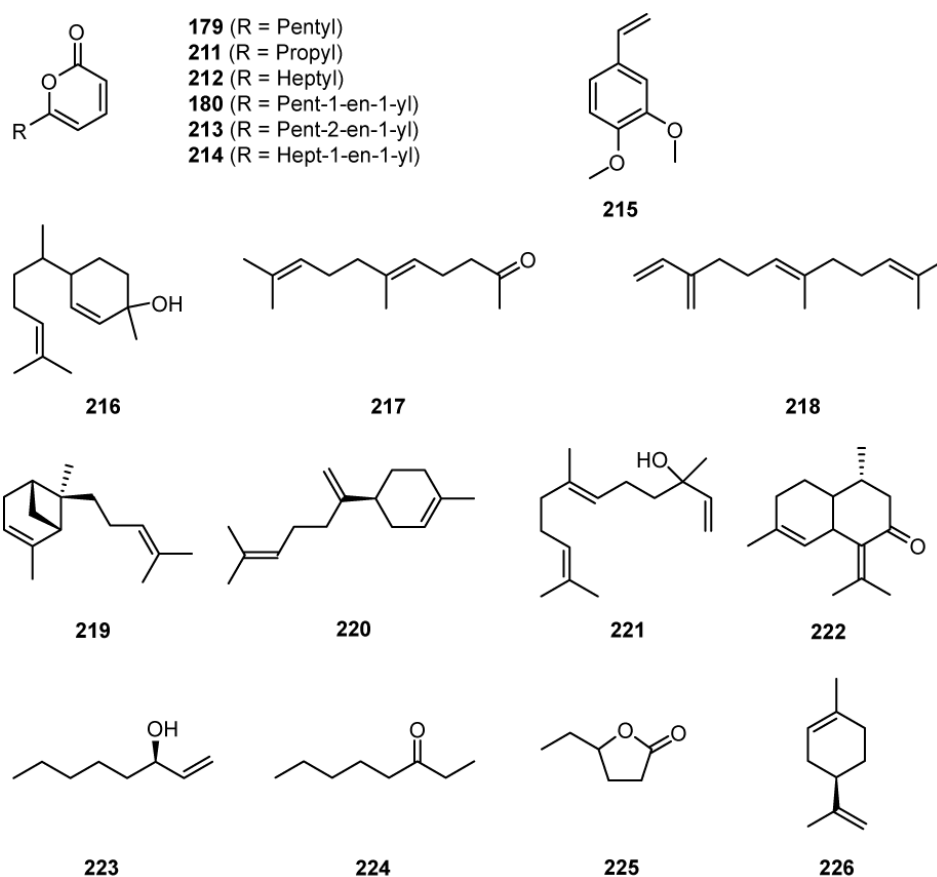


Abbildung 20: Flüchtige Verbindungen produziert von *T. viride* und *T. asperellum*.

3.2 Flüchtige Duftstoffe von *T. viride*

Die Hauptkomponente 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on (**179**) wird in großen Mengen (> 90 % der Gesamtfläche nach Peakintegration) von dem Pilz abgesondert (vgl. Tabelle 2). Diese Verbindung wurde durch Vergleich des Massenspektrums (vgl. Abbildung 22A) mit der Spektrenbibliothek und eines kommerziell erhältlichen Standards direkt identifiziert. Es finden sich weiterhin Spuren des Terpenoids Geranylaceton (**217**), die Sesquiterpene (*E*)- β -Farnesen (**218**), *trans*- α -Bergamoten (**219**) und Zingiberenol (**216**) sowie 3,4-Dimethoxystyrol (**215**). Die typischen Pilzkomponenten 1-Octen-3-ol (**223**) und 3-Octanon (**224**) konnten auch nachgewiesen werden. Zusätzlich zu der bereits identifizierten Hauptkomponente **179** zeigten sich zwei weitere Verbindungen in Spuren, deren Massenspektren ähnlich zum Massenspektrum von **179** waren. Das Massenspektrum der ersten Verbindung zeigte ein Molekülion von $m/z = 138$ (Abbildung 22B) während das Massenspektrum der zweiten Substanz ein Molekülion von $m/z = 194$ (Abbildung 22C) aufzeigte. Aufgrund der Massendifferenz von minus 28 und plus 28 atomaren Masseneinheiten im Vergleich zur Hauptkomponente **179** und der ansonsten allgemeinen Gemeinsamkeit der Massenspektren, wurde darauf geschlossen, dass es sich bei den unbekannten Verbindungen einerseits um ein verkürztes Homolog, 6-Propyl-2*H*-pyran-2-on (**212**), und andererseits das verlängerte Isomer, 6-Heptyl-2*H*-pyran-2-on (**213**) handeln sollte. Die Synthese der Referenzverbindungen wird in Abschnitt 3.3.1. beschrieben.

Eine weitere Spurenkomponente im Totalionenchromatogramm von *T. viride*, die wenig später eluierte ($I = 1533$) als **179** ($I = 1464$), zeigte ein Molekülion mit $m/z = 164$ (Abbildung 22D). Bei dieser Verbindung sollte es sich um ein ungesättigtes Analog von **179** handeln. Aufgrund des höheren Retentionsindex, verglichen mit **179**, wurde die Struktur von (*E*)-6-(Pent-1-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**180**) vermutet. Diese besitzt ein erweitertes π -System und somit eine erhöhte Polarität, was eine längere Verweilzeit auf der stationären Phase bewirkt und damit die Retentionszeit erhöht. Vorrausgegangene Identifizierungen von dieser Substanz in *T. harzianum* und *T. viride* bestätigten diese Annahme.^[159,161]

Weiterhin wurde ein flüchtiger Duftstoff mit einem Molekülion von $m/z = 192$ und einem ähnlichen Fragmentierungsmuster (vgl. Abbildung 22E) wie **180** gefunden. Dabei sollte es sich um das um 2 Methyleinheiten verlängerte Analog von **180** handeln. Die Synthese von

(*E*)-6-(Hept-1-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**214**), sowie Vergleich der Massenspektren und Retentionsindices bestätigten diese Annahme.

Tabelle 2: Identifizierte Verbindungen aus den Headspace-Extrakten von *T. viride* (gemessen nach 6 Tagen Inkubation) und *T. asperellum* (gemessen nach 4 Tagen Inkubation)

Verbindung ^[a]	<i>I</i> ^[b]	<i>I</i> _{Lit} ^[c]	Identität ^[d]	<i>T. viride</i> ^[e]	<i>T. asperellum</i> ^[e]
1-Octen-3-ol (223)	982	978	MS/RI	+	-
3-Octanon (224)	990	999	MS/RI	+	-
Limonen (226)	1029	1033	MS/RI	+	+
γ -Hexalacton (225)	1056	1055	MS/RI	-	+
6-Propyl-2 <i>H</i> -pyran-2-on (211)	1251	n. a.	Syn, MS/RI	+	+
3,4-Dimethoxystyrol (215)	1369	1365	Syn, MS/RI	+	+
<i>trans</i> - α -Bergamoten (219)	1438	1434	MS/RI	+	+
Geranylaceton (217)	1455	1453	MS/RI	+	+++
(<i>E</i>)- β -Farnesen (218)	1459	1456	MS/RI	+	+
6-Pentyl-2 <i>H</i> -pyran-2-on (179)	1464	n. a.	Syn, MS/RI	+++	++
(<i>E</i>)-6-(Pent-2-en-1-yl)-2 <i>H</i> -pyran-2-on (213)	1468	n. a.	Syn, MS/RI	-	++
Amorpha-4,7(11)-dien-8-on (222)	1482	1476	MS/RI	-	+
β -Bisabolen (220)	1511	1513	MS/RI	-	+
(<i>E</i>)-6-(Pent-1-en-1-yl)-2 <i>H</i> -pyran-2-on (180)	1533	n. a.	Syn, MS/RI	+	+++
<i>trans</i> -Nerolidol (221)	1566	1565	MS/RI	+	++
Zingiberenol (216)	1634	1632	MS/RI	+	++
6-Heptyl-2 <i>H</i> -pyran-2-on (212)	1677	n. a.	Syn, MS/RI	+	-
(<i>E</i>)-6-(Hept-1-en-1-yl)-2 <i>H</i> -pyran-2-on (214)	1744	n. a.	Syn, MS/RI	+	+

[a] Nicht identifizierte Verbindungen und Medienkomponente werden nicht erwähnt. [b] Retentionsindices wurden wie in Abschnitt VIII.1.3 beschrieben bestimmt. [c] Literaturdaten gemessen auf der gleichen HP-5 Säule gemessen. [d] Synthetisierte Referenzen (Abk.: Syn.) oder MS und RI Literaturdaten wurden zum Vergleich genutzt. [e] Relative Mengen der flüchtigen Verbindungen eines Extrakts sind gekennzeichnet mit +: 0-2 %, ++: 2-8%, +++: > 8 % bezogen auf die Gesamtfläche aller Peaks eines Gaschromatogramms. Die Kennzeichnung der Verbindungen ist nur innerhalb eines Chromatogramms miteinander vergleichbar.

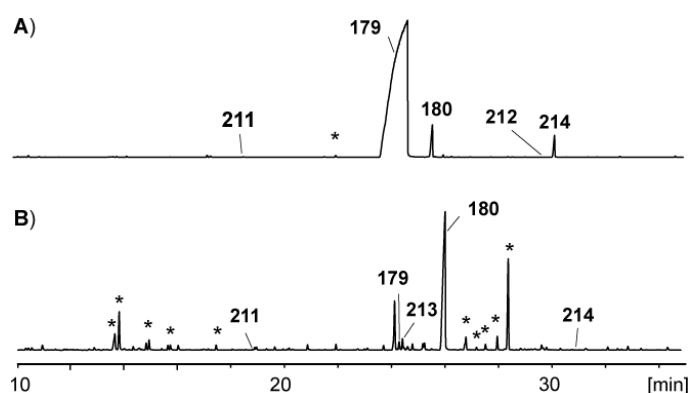


Abbildung 21: Totalionenchromatogramme der Headspace-Extrakte von A) *Trichoderma viride* und B) *Trichoderma asperellum*. Peaks markiert mit einem Sternchen kennzeichnen nicht identifizierte Verbindungen oder Verbindungen aus dem Medium.

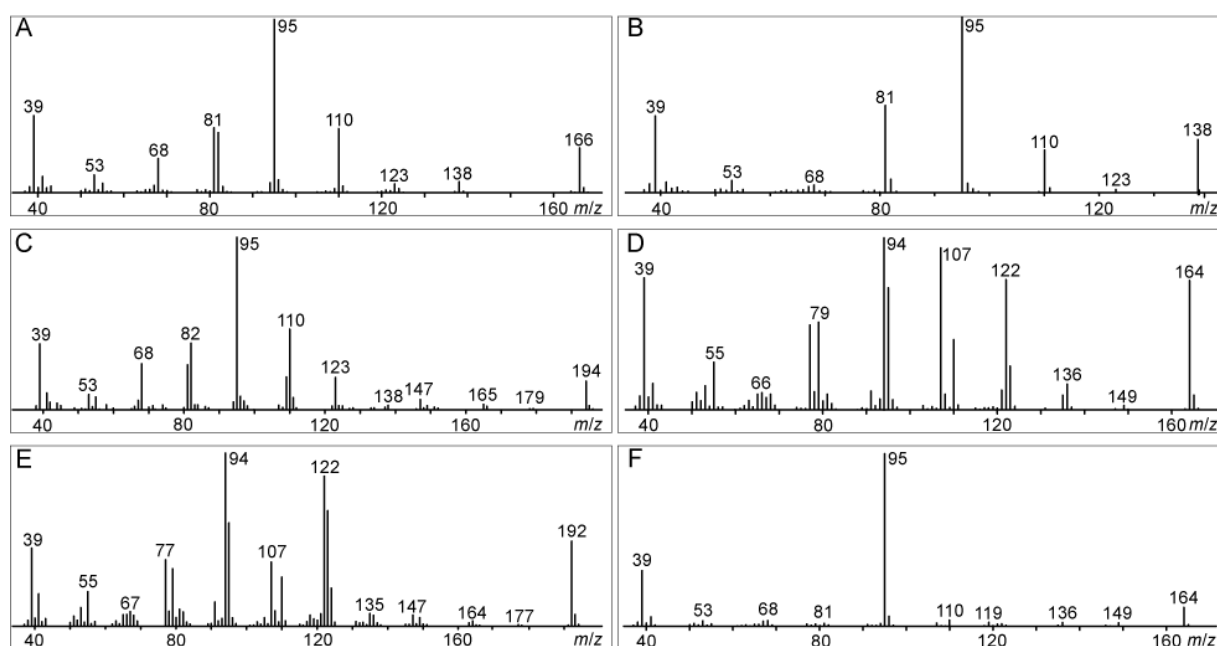


Abbildung 22: EI-Massenspektren von (A) 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on (**179**), (B) 6-Propyl-2*H*-pyran-2-on (**212**), (C) 6-Heptyl-2*H*-pyran-2-on (**213**), (D) (*E*)-6-(Pent-1-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**180**), (E) (*E*)-6-(Hept-1-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**214**) und (F) tendenziell identifiziertes (*E*)-6-(Pent-2-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**215**).

Neben den alkylierten und alkenylierten α -Pyrone konnte eine weitere Komponente in Spuren detektiert werden (vgl. Abbildung 23). Das Massenspektrum zeigt ein Molekülion von $m/z = 164$. Zusätzlich sind hier Fragmentionen, die auf ein aromatisches System hindeuten wie $m/z = 77$ (entsprechend zu $C_6H_5^+$) und $m/z = 91$ (wie $C_7H_7^+$) zu erkennen. Das Bibliotheksmassenspektrum zu 3,4-Dimethoxystyrol (**215**) zeigt sehr gute Ähnlichkeit zu dem in Abbildung 23 dargestellten Massenspektrum. Eine Synthese von **215** ausgehend von Vanillin ist in Abschn. 3.3.2 beschrieben. Die Identität von **215** aus dem Headspace-Extrakt von *T. viride* konnte durch Vergleich des Massenspektrums und des Retentionsindex zur synthetischen Referenz bestätigt werden. Verbindung **215** wurde bereits vorher aus Lebermoos^[187] und als Komponente von Röstkaffee^[188] beschrieben.

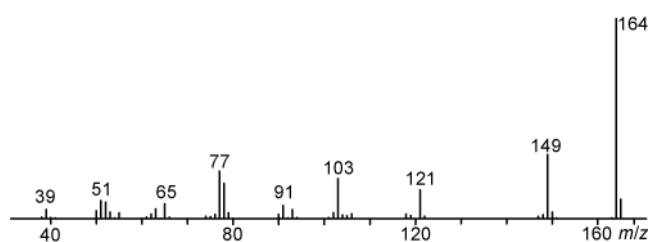


Abbildung 23: EI-Massenspektrum von Dimethoxystyrol (**215**).

3.3 Flüchtige Duftstoffe von *T. asperellum*

Die gleiche analytische Methodik, die zur Identifizierung der flüchtigen Duftstoffe von *T. viride* führte, wurde auch bei *T. asperellum* angewandt. Ein repräsentatives Gaschromatogramm eines Headspace-Extrakts einer Agarplattenkultur von *T. asperellum* nach 4 Tagen Inkubation ist in Abbildung 21B dargestellt. Eine Auflistung der identifizierten Verbindungen findet sich in Tabelle 2. Die Hauptkomponente **180** konnte durch Vergleich mit der synthetischen Referenz bestätigt werden. Weitere Pyronderivate mit gesättigter Seitenkette wie **179** und **211** wurden identifiziert. Ferner wurden **217** in großen Mengen sowie Spuren von **215** von *T. asperellum* produziert. Zusätzlich wurde eine unbekannte Verbindung gefunden, die ein Molekülion mit einer Masse von $m/z = 164$ und einen Basispeak mit einer Masse von $m/z = 95$ aufzeigte (Abbildung 22F). Für diese Verbindung wurde eine ungesättigte Doppelbindung in der Seitenkette vermutet und somit ein Isomer von **180**, wobei die Position der Doppelbindung in der Seitenkette an einer anderen Stelle lokalisiert sein sollte.

Ein Versuch (*E*)-6-(Pent-2-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**213**) zu synthetisieren schlug fehl, da diese Verbindung sehr empfindlich war und die Doppelbindung der Seitenkette ins konjugierte π -System isomerisierte und damit Verbindung **180** lieferte. Eine sofortige GC-MS-Analyse des Rohprodukts nach Aufarbeitung zeigte die Präsenz zweier Verbindungen, wobei das Hauptprodukt **180** darstellte, begleitet von **213** in Spuren. Vergleich der Massenspektren und des Retentionsindex bestätigte **213** als Naturprodukt. Da NMR spektroskopische Daten des synthetischen Nebenprodukts nicht erhalten werden konnten, bleibt eine abschließende Strukturaufklärung des Duftstoffs (*E*)-6-(Pent-2-en-1-yl)-2*H*-pyran-2-on (**213**) nur vorläufig.

Die Analyse der flüchtigen Duftstoffe abgegeben von *T. viride* und *T. asperellum* resultiert in der Identifizierung eines Musters einiger alkylierter und alkenylierter α -Pyrone mit unterschiedlicher Länge der Seitenkette und verschiedener Positionierung der Doppelbindung. Die Verbindungen **179** und **180** wurden in beiden Headspaceextrakten identifiziert, wobei **179** als Hauptverbindung von *T. viride* abgegeben wurde und *T. asperellum* überwiegend **180** produziert. Diese Duftstoffe wurden bereits aus *Trichoderma* Stämmen beschrieben.^[158,159] Das hohe Potential der CLSA-Headspace-Methode konnte hier durch den Nachweis zuvor noch nicht identifizierter α -Pyrone wie **211-214** gezeigt werden. Um die Leistungsfähigkeit der CLSA-Methode vollständig auszuschöpfen und sämtliche von den Pilzen produzierten

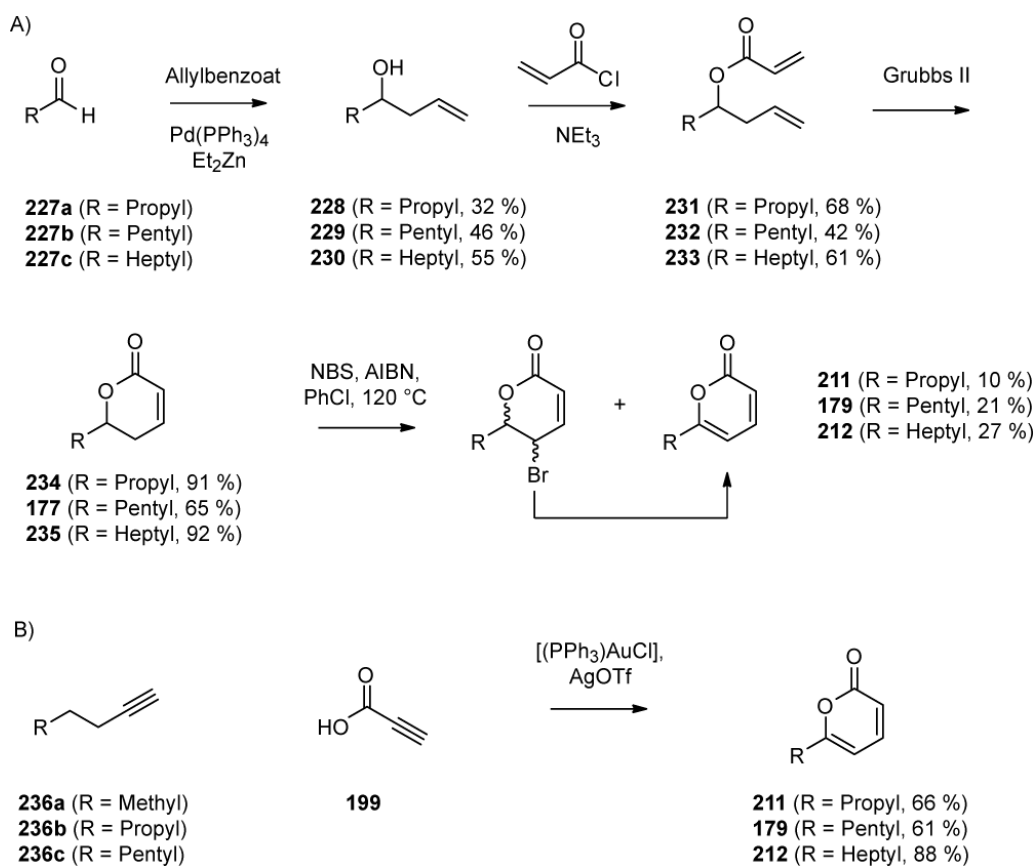
α -Pyrone zu erfassen, wurde in einem Zeitreihenexperiment die Produktion der flüchtigen Duftstoffe über mehrere Tage überwacht (vgl. Abschn. 3.4). Normalerweise werden für die Identifizierung von Naturstoffen große Volumina Kulturen extrahiert, die in aufwendigen chromatographischen Stufen aufgereinigt werden. Während dieser Reinigungsabläufe werden Spurenkomponenten teilweise nicht bemerkt, insbesondere flüchtige Komponenten gehen während den Konzentrierungsprozessen verloren. Die Anwendung der CLSA-Headspace-Methode und folgende Analyse der erhaltenen Extrakte vermeidet eine Fraktionierung und demzufolge kann die Gefahr Spurenkomponenten zu verlieren weitestgehend eliminiert werden. Allerdings kann eine eindeutige Strukturaufklärung häufig nur durch Vergleich von Referenzsubstanzen abgeklärt werden, die mittels Synthese zugänglich gemacht werden können.

3.3.1 Synthese der 6-Alkyl-2*H*-pyranone und 6-Alkenyl-2*H*-pyranone

Ein publizierter Ansatz zur Synthese von 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on startet mit der Formylierung von 3-Heptanon zum korrespondierenden Hydroxymethylketon, gefolgt von einer KNOEVENAGEL-Kondensation mit Malonsäure zur Ketosäure. Eine Bearbeitung mit Essigsäureanhydrid liefert 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on.^[189] Für die Synthese der 6-Alkyl-2*H*-pyranone **179**, **211** und **212** wurde eine Route entwickelt, die eine radikalische Bromierung von 5-Alkylpent-2-en-5-oliden gefolgt von einer Dehydrobromierung als Schlüsselstufe beinhalten sollte (Schema 21A). Diese Reaktionen wurden in der erfolgreichen Synthese von einem α -Pyronsystem ausgehend von Pent-2-en-5-olid ($R = H$) beschrieben.^[190]

Um diesen Ansatz zu verfolgen wurden die Aldehyde **227a-c** in die Homoallylalkohole **228-230** mit Allylbenzoat, Diethylzink und $[Pd(PPh_3)_4]$ umgesetzt.^[191] Die Behandlung mit Acryloylchlorid in Triethylamin lieferte die Homoallylacrylate **231-233**, die in die α,β -ungesättigten Lactone **234**, Massoialacton (**177**) und **235** über Ringschlussmetathese mit Hilfe des Grubbs' Katalysators 2ter Generation zyklisiert wurden.^[192] Die anschließende radikalische Bromierung mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) / Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) in Chlorbenzol (120 °C) lieferte eine komplexe Mischung der diastereomer-isomeren Bromierungsprodukte. Die Dehydrobromierung mit Triethylamin resultierte in der

Umwandlung der bromierten Derivate in die jeweiligen 6-Alkyl-2*H*-pyranone **179**, **212** und **213**, die durch mehrmalige säulenchromatographische Aufreinigung isoliert werden konnten

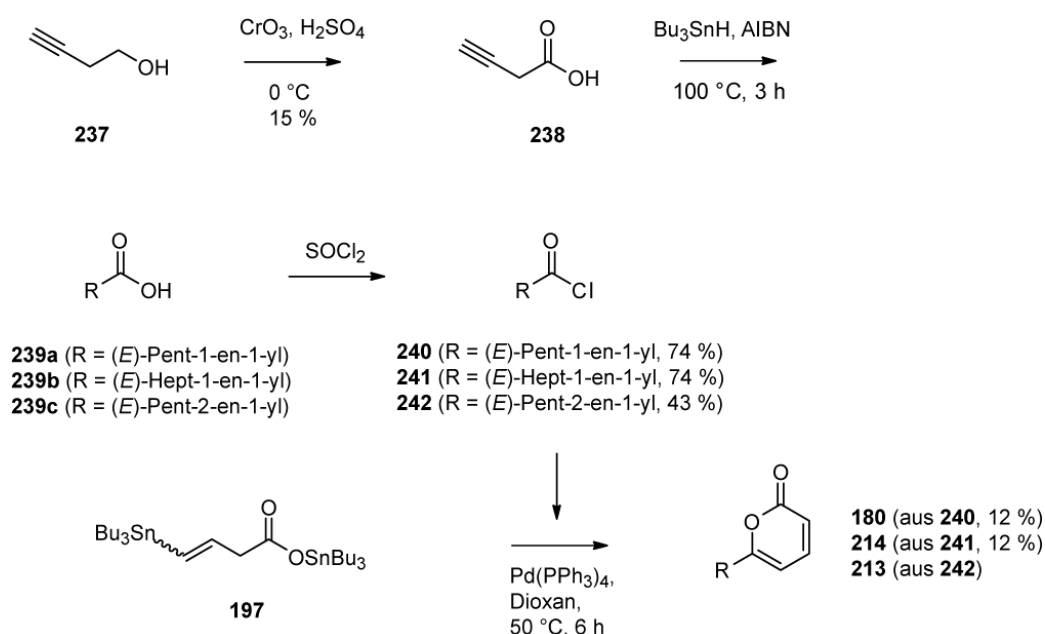


Schema 21: Synthese der 6-Alkyl-2*H*-pyranone.

Nach Abschluss dieser Syntheseroute publizierte SCHREIBER eine goldkatalysierte Kupplungsreaktion von terminalen Alkinen mit Propiolsäure zu Pyronen.^[175] Da die Ausbeuten des Bromierungs-Dehydrobromierungsansatz wenig zufrieden stellend waren, weil sie wesentlich geringer ausfielen als für das publizierte Pyronstammsystem (70 %), wurde die Synthese von **179**, **212** und **213** über den Goldkatalyse Ansatz wiederholt. Die Kupplungsreaktion wurde mit Propiolsäure (**199**) und 1-Pentin (**236a**), 1-Heptin (**236b**) und 1-Nonin (**236c**) durchgeführt (vgl. Schema 21B). Die Produkte **179**, **212** und **213** wurden in Ausbeuten von 61-88 % in Übereinstimmung mit den publizierten Daten (65 % für **179**) erhalten.

Ein publizierter Syntheseansatz zu **214** erfolgt über STILLE Reaktion von Tributylstannyl-4-(tributylstannyl)but-3-enoat (**197**). Dieses wurde über JONES Oxidation von kommerziell

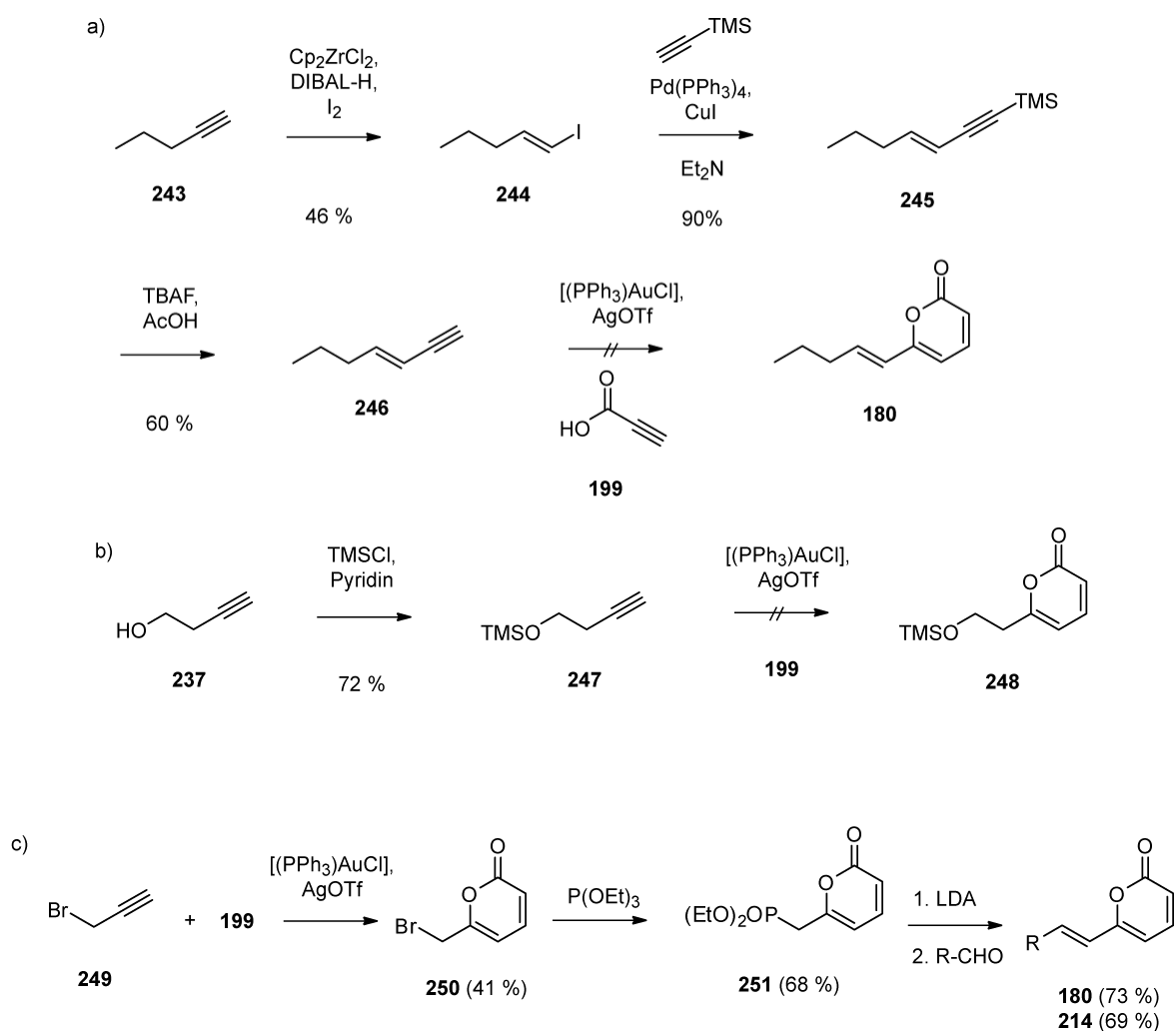
erhältlichem Homopropargylalkohol (**237**) zu 3-Butinsäure (**238**) umgesetzt. Radikalische Hydrostannylierung von **238** lieferte **197**, das mit den entsprechenden Säurechloriden (**240-242**) lactonisiert wurde (vgl. Schema 22).^[173] Auf diese Weise konnten erfolgreich die Verbindungen **180** und **214** erhalten werden, wobei die publizierte Ausbeute für **180** von 52 % auch in mehreren Ansätzen nicht nachvollzogen werden konnten. Die Synthese von **213** stellte sich als schwierig heraus, wegen der raschen Isomerisierung der Doppelbindung der Seitenkette in das konjugierte System resultierend in **180**. Wie oben diskutiert, konnte dennoch nach GC-MS Analyse des Syntheserohprodukts das Massenspektrum und der Retentionsindex als übereinstimmend mit dem gesuchten Naturstoff aus *T. asperellum* gewertet werden und verbleibt in einer vorläufigen Identifizierung.



Schema 22: Synthese der (E)-Alken-1-yl-2H-pyranone mittels STILLE Reaktion.

Da die Synthese der 6-Alkenyl-2H-pyranone mit toxikologisch sehr bedenklichen Organozinnverbindungen durchgeführt wurde und zudem die Ausbeuten gering ausfielen, wurde eine neue Synthese, die die effiziente Goldkatalyse mit einbindet, entwickelt (vgl. Schema 23). Der erste Ansatz ging von einer Zyklisierung zuvor synthetisierter Enine aus (Schema 23a). Es wurde Pentin (**243**) zuerst mit Iod halogeniert und lieferte Verbindung **244**.^[193] Diese wurde in einer SONOGASHIRA-Kupplung mit Ethinyltrimethylsilan zu Enin **245** umgesetzt.^[194] Anschließende Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) brachte

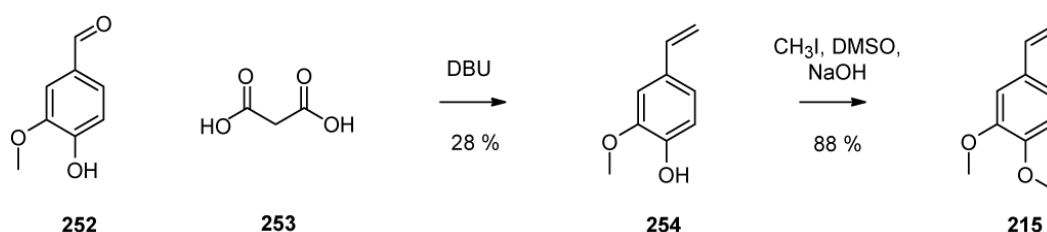
Hept-3-en-1-in (**246**) hervor, das mittels abschließender Goldkatalyse mit **199** lactonisiert werden sollte. Dabei konnte auch nach längerer Reaktionszeit keine Produktbildung zu **180** festgestellt werden. In einem weiteren Syntheseansatz sollte das TMS geschützte Alkinol **247** unter Goldkatalyse mit **199** zu Pyron **248** cyclisiert werden. Jedoch zeigte sich auch hier nicht die gewünschte Produktbildung (vgl. Schema 23b). Im letzten Ansatz wurde Verbindung **250** durch die goldkatalytische Kupplung von Propargylbromid (**249**) mit **199** erhalten. Anschließend wurde **250** mit Triethylphosphit in das Diethylphosphonat (**251**) umgesetzt. Abschließende HORNER-WADSWORTH-EMMONS Reaktion mit Butyraldehyd bzw. Hexanal lieferte die Alkenylpyrone **180** und **214** in akzeptablen Ausbeuten (Schema 23c).



Schema 23: Synthese der (*E*)-Alken-1-yl-2*H*-pyranone mittels Goldkatalyse.

3.3.2 Synthese von Dimethoxystyrol

Die Synthese des Dimethoxystyrols (**215**) wurde in zwei Stufen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde Vanillin (**252**) mit Malonsäure (**253**) in einer KNOEVENAGEL-Kondensation mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Base zu 4-Hydroxy-3-methoxystyrol (**254**) umgesetzt.^[195] Im zweiten Schritt wurde die *para*-Hydroxygruppe durch Einsatz von Methyljodid zum Zielmolekül **215** methyliert (Schema 24).



Schema 24: Synthese von Dimethoxystyrol (**215**).

3.4 Zeitreihenexperimente

Zur Identifizierung sämtlicher gebildeter 6-Alkyl-2*H*-pyranon- und 6-Alkenyl-2*H*-pyranonisomere produziert von *T. viride* und *T. asperellum* wurde ein Zeitreihenexperiment mittels der nicht invasiven CLSA-Methode durchgeführt. Dabei wurden 8 Agarplatten an einem Tag mit den Pilzen angeimpft, wobei die Duftstoffe der ersten Platte sofort für 24 Stunden mittels CLSA-Methode extrahiert wurden. Die restlichen Agarplatten wurden bei 28 °C inkubiert und pro Tag wurden die Duftstoffe je einer Kultur per CLSA gesammelt und die erhaltenen Extrakte anschließend mit GC-MS analysiert. Diese Messungen wurden für einen Zeitraum von einer Woche durchgeführt. Abbildung 24 zeigt die Totalionenchromatogramme der täglichen GC-MS Analyse über den Zeitraum. Die Angabe der Tage hierbei bezieht sich auf die Inkubationszeit.

T. viride (Abbildung 24 a) produziert bereits nach einem Tag seine Hauptkomponente 6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on (**179**), gefolgt von **214** nach zwei Tagen Inkubation. Die Maximumproduktion der verschiedenen identifizierten 6-Alkyl-2*H*-pyranon- und 6-Alkenyl-2*H*-pyranonisomere kann nach einer Inkubationszeit von 5-6 Tagen festgestellt werden.

Bereits nach sieben Tagen Inkubation wird nur noch die Hälfte der unterschiedlichen α -Pyrone von *T. viride* abgegeben.

Auch *T. asperellum* synthetisiert seine Hauptkomponente **180** bereits nach eintägiger Inkubation (Abbildung 24b). Nach drei Tagen Wachstum erzeugt der Pilz alle identifizierten α -Pyrone. Die maximale Produktion liegt bei vier Tagen Inkubation. Im Gegensatz zu *T. viride* nimmt im Verlauf des Experiments nur die Intensität, nicht aber die Vielfältigkeit der gebildeten 6-Alkyl-2*H*-pyranon- und 6-Alkenyl-2*H*-pyranonisomere ab. Alle α -Pyrone, die nach drei Tagen gebildet wurden, konnten auch nach einer Inkubationszeit von acht Tagen nachgewiesen werden.

Um die relativen Mengen der gebildeten α -Pyrone miteinander zu vergleichen zu können wurden die größten Integrale der jeweiligen Hauptkomponente der beiden Spezies auf 100 % skaliert und alle anderen Flächen in Abhängigkeit von der Hauptkomponente berechnet. Die Darstellung der relativen Mengen an gebildeten α -Pyronen in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 25 zu finden.

T. viride produziert die größten relativen Mengen **179** nach 4-5 Tagen Inkubation. Insgesamt zu sehen ist, dass **179** über alle Messtage hinweg die Hauptverbindung des Pilzes ist. Verbindung **180** hingegen wird erst nach drei Tagen Inkubation produziert. Die Minorkomponenten **212** und **213** können ab dem fünften Tag Inkubation beobachtet werden. Die 2*H*-Pyran-2-on-Derivate **179**, **180**, **212** und **213** durchlaufen nach sechs Tagen Inkubation ein einziges Maximum. Daneben wird das Alkenylpyron **214** nach zwei Tagen gebildet, erfährt nach dem dritten Tag der Inkubation ein Maximum, welches in den folgenden zwei Tagen wieder abfällt und nach sieben Tagen Inkubation wieder ansteigt. Nach sieben Tagen Inkubation wird eine zweite Maximumproduktion verzeichnet, wobei aufgrund der angewandten halbquantitativen Methodik und den geringen analysierten Mengen der Verbindung **214** das zweite Maximum möglicherweise einen Ausreißer darstellt. Weiterhin zu sehen ist, dass die Minorkomponenten **180** und **214** mit einer relativen Menge von höchstens 1 % auftreten und die Verbindungen **212** und **213** sogar nur bis 0.01 %.

T. asperellum synthetisiert nach vier Tagen große relative Mengen an **180**, während die Verbindung **179** nach einer Maximumproduktion innerhalb von drei Tagen im weiteren Verlauf sinkt. Die Minorkomponenten stellen die Verbindungen **215**, **214** und **212** mit 0.01-1.5 % relativen Mengen dar. Eine Maximumproduktion kann nach 3-4 Tagen Inkubation

festgestellt werden. Während die Produktion der Verbindungen der Verbindungen **179**, **212** und **214** nach einem Maximum nach 3-4 Tagen stetig fällt, scheint die Synthese der Alkenylpyrone **180** und **215** nach einem Tiefpunkt nach sieben Tagen Inkubation wieder anzusteigen. Auch hier könnte der Produktionsabfall der Pyrone **180** und **213** an Tag 7 methodenbedingt sein, sodass weitere Analysen und längere Inkubationszeiten Aufschlüsse darüber liefern würden.

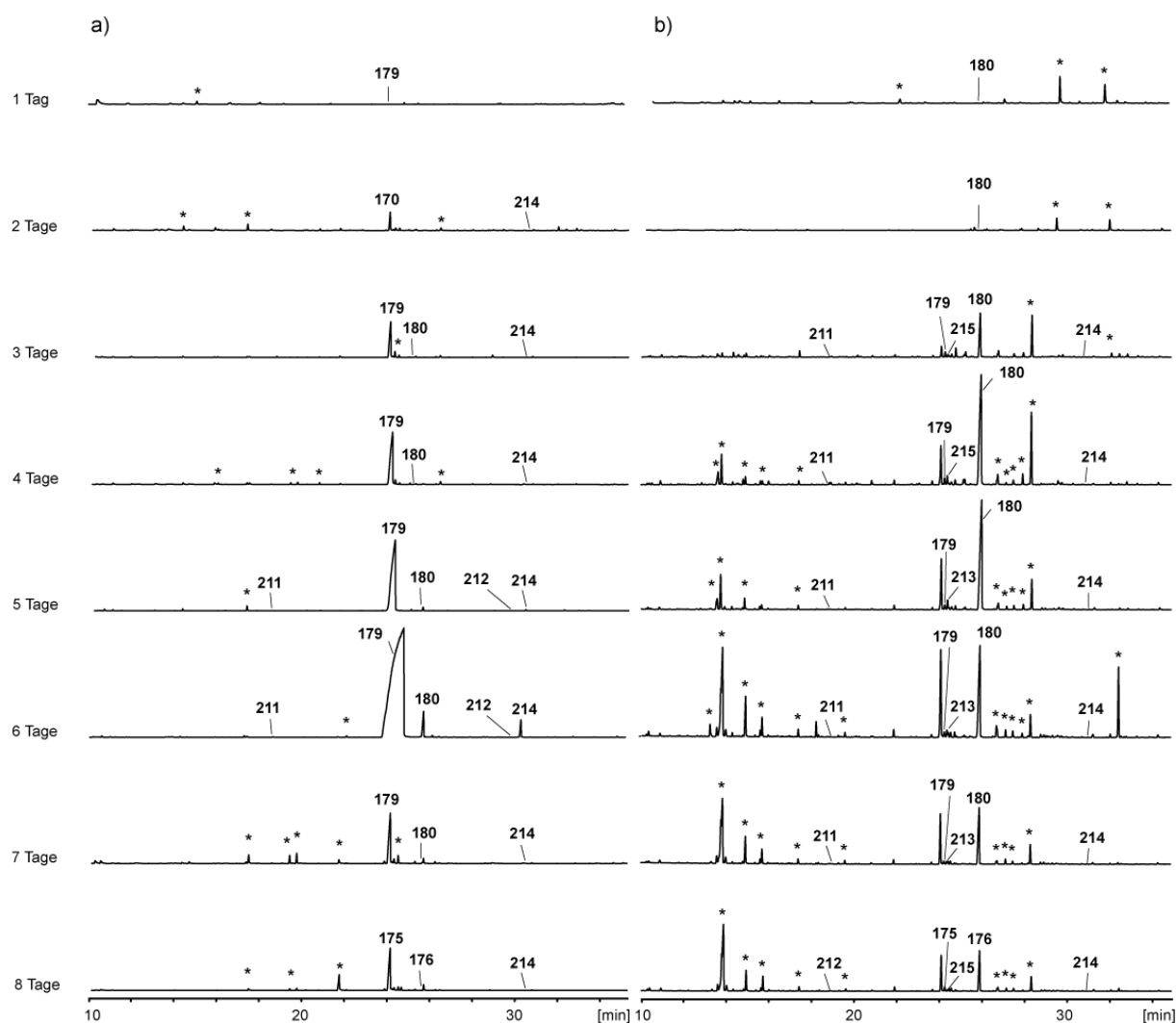


Abbildung 24: Totalionenchromatogramme der Zeitreihenexperimente von *T. viride* (a), und *T. asperellum* (b). Sternchen bezeichnen nicht identifizierte Verbindungen oder Artefakte.

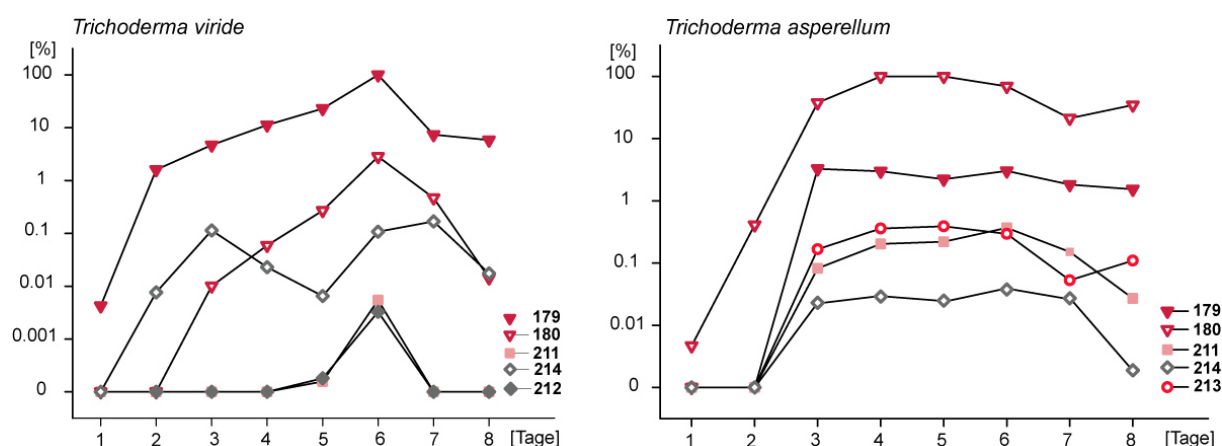


Abbildung 25: Zeitreihe der relativen Mengen an 2H-Pyran-2-derivaten produziert von *T. viride* und *T. asperellum*.

Im Vergleich produziert *T. asperellum* große Mengen an Pyron **179** begleitet von **180** während *T. viride* Pyron **179** vorzugsweise freigibt zusammen mit **180**. Die Minorkomponenten beider Pilze sind die Pyrone **214** und **212**. Im Gegensatz zu *T. asperellum*, stellt *T. viride* zusätzlich die Verbindung **213** zur Verfügung, wobei *T. asperellum* der alleinige Produzent des Pyrons **215** ist.

4. Zusammenfassung Pyrone aus *T. asperellum* und *T. viride*

Es wurden die flüchtigen Duftstoffe der Bodenpilze *T. asperellum* und *T. viride* mit der CLSA-Methode gesammelt und mittels GC-MS analysiert. Beide Pilze lieferten ein Profil verschiedener 2H-Pyranone. Über die Hauptkomponenten **179**, gebildet von *T. viride* und **180** von *T. asperellum* wurde schon von anderen *Trichoderma* Gattungen berichtet. Darüber hinaus konnten die drei weiteren 2H-Pyranone **212-214** identifiziert werden. Ferner wurden Strukturüberlegungen ausgehend von den erhaltenen Massenspektren gemacht und diese über Synthese von Referenzen bestätigt. Für die Synthese der 6-Alkyl-2H-pyranone wurde ein Ansatz entwickelt, der eine radikalische Bromierung von δ -Lactonen und sofortiger Eliminierung von Bromwassertoff beinhaltet, während die 6-Alkenyl-2H-pyranone über einen bereits publizierten STILLE Kupplungslactonisierungsansatz zugänglich gemacht wurden.^[173] Als beste Synthesemethode stellte sich jedoch eine gold-katalysierte Kupplung von Propiolsäure mit terminalen Alkinen heraus.^[175] Abschließend wurde die Produktion der

2*H*-Pyrane in Abhängigkeit von der Inkubationszeit getestet. *T. viride* produziert nach vier Tagen Wachstum die meisten verschiedenen 2*H*-Pyrane, wohingegen *T. asperellum* erst nach sechs Tagen Wachstum die Maximalproduktion an 2*H*-Pyranen erreicht.

V. Lactone aus *Geniculosporium* sp.

1. Der Endophyt *Geniculosporium* sp.

Der Genus *Geniculosporium* spp. wird vertreten durch die Klasse der endophytischen Pilze.^[196] Im Normalfall kolonisieren endophytische Pilze lebendes Pflanzengewebe und wachsen dort ohne sichtbaren Schaden an der Pflanze zu verursachen. Sie kommen in fast allen Bäumen, Gräsern, Algen und Kräuterpflanzen vor. Bei Schwächung der Pflanze durch Stress, besteht jedoch die Möglichkeit, dass der endophytische Pilz pathogen für die Pflanze wird.^[197,198]

Auf der anderen Seite haben Untersuchungen gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen dem Endophyt und seiner Wirtspflanze auch gegen Phytopathogene wirksam sein kann.^[199] Unter den Aspekten wie nicht realisierbare Kosten, sowie Abbaubarkeit in der Umwelt und mögliche Resistenzentwicklung eines Befalls sollten bislang im Kakaoanbau in Mittel- und Westafrika verwendete kupfer- und metalaxylbasierte Fungizide durch natürliche Biokontrollagentien ersetzt werden. Dafür wurde der Endophyt *Geniculosporium* sp. von Kakaoblättern (*Theobroma cacao*) isoliert und als mögliches Biokontrollagens gegen die black pod Krankheit getestet. Diese wird verursacht von *Phytophthora megakarya* und kann jährlich einen Ertragsausfall von 30-90 % für die Landwirte bedeuten. In diesem Auswahlverfahren stellte sich heraus, dass einige Stämme von *Geniculosporium* sp. befähigt sind *P. megakarya* zu beherrschen und der Endophyt als Alternative für chemische Fungizide in Betracht gezogen werden kann.^[196]

Die mutualistische Wechselbeziehung zwischen Endophyt und Pflanze wird durch die Produktion von Sekundärmetaboliten begleitet, die unterschiedliche bioaktive Eigenschaften besitzen und sowohl biologisch als auch pharmakologisch von besonderem Interesse sein können.^[200] Eine algizide Wirkung konnte aus dem Ethylacetat-Extrakt aus *Geniculosporium* sp. 2121 aus *Teucrium scorodina* abgeleitet werden, die u. a. durch das isolierte Diterpen Geniculol (**255**) (Abbildung 26) hervorgerufen wurde. Weiterhin wurde eine Wachstumsförderung des Endophyten durch die Anwesenheit seiner Wirtspflanze *T. scorodina* nachgewiesen.^[197] Aus dem Extrakt eines weiteren endophytischen Pilz aus dem Genus *Geniculosporium* sp. 6580, der vergesellschaftet mit der Rotalge *Polysphonia* lebt, wurden Botryan Metabolite wie 7-Hydroxy-10-methoxy-deacetyldihydrobotrydial (**256**) und 7-Hydroxydeacetyl-botryenalol (**257**) isoliert, die antimikrobielle Wirkung gegen *Bacillus megaterium*, *Chlorella fusca* und *Microbotryum violaceum* aufweisen.^[201] Aus

Duftstoffextrakten von *Geniculosporium* sp. 9910 aus *Cistus monspelliensis* konnten sogar die bisher unbekannten halogenierten Metaboliten Chlorodimethoxybenzol (**258**) und Dichlorodimethoxybenzol (**259**) identifiziert werden, deren biologische Funktion noch nicht ermittelt wurde.^[202]

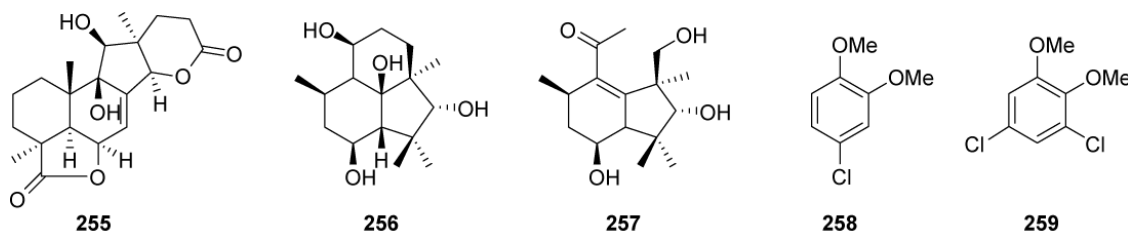


Abbildung 26: Sekundärmetabolite aus *Geniculosporium* sp..

2. γ -Lactone in der Natur

Unter Lactonen werden cyclische Verbindungen verstanden, die durch Esterbindung einer Hydroxy- und Carboxyl-Gruppe desselben Moleküls einen Ring bilden. In Abhängigkeit von der Position der Hydroxy-Gruppe vor der Zyklisierung der Hydroxycarbonsäure findet eine Differenzierung von α - ϵ -Lactonen statt. Das einfachste γ -Lacton ist γ -Butyrolacton (**260**) (Abbildung 27) und resultiert aus der Veresterung des Betäubungsmittels γ -Hydroxybuttersäure.

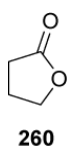


Abbildung 27: Strukturformel von γ -Butyrolacton.

In der Natur ist das γ -Lacton-Motiv weit verbreitet und bietet die unterschiedlichsten Eigenschaften (vgl. Abbildung 28). In der Lactonfraktion von Lavendelöl (*Lavandula vera*) konnte 5-Ethenyldihydro-5-methylfuran-2-on (**261**), das heute unter dem Lavendel-Lacton bekannt ist, identifiziert werden.^[203] Das γ -Decanolacton (**262**) ist verantwortlich für eine fruchtig pfirsichartige Note wie sich aus Untersuchungen von Extrakten aus Pfirsichen (*Prunus*) ergab.^[204] Aus dem marinen Pilzisolat I96S215 eines Schwamms aus Indonesien konnte das Hexaketid *iso*-Cladospolid B (**263**) als Isomer des Makrozyklus Cladospolid B nachgewiesen werden.^[205] Autoregulatorische Fähigkeiten werden den γ -Lactonen aus

Streptomyceten zugesprochen. Die Konzentration des ausgeschütteten Autoinducers Faktor A (**264**) legt dabei die Produktion des Antibiotikums Streptomycin in *Streptomyces griseus* fest sowie die Bildung des Myzels.^[206–208] Flüchtige Butenolide, dessen Funktionen noch nicht bekannt sind, wurden in einem Screening der Gasraumanalysen von 45 Actinomyceten ermittelt. Neben strukturell vielseitigen Lactonen wurden ganze Serien von Butenoliden mit alkylierten Seitenketten nachgewiesen (**265a-d**, **266**).^[209,210]

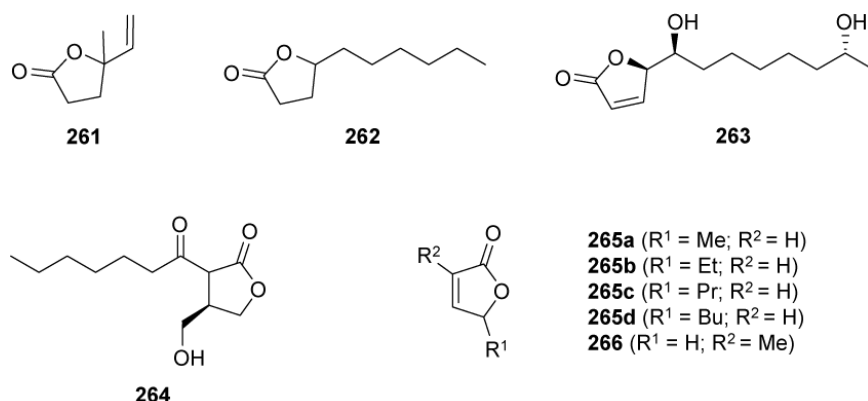
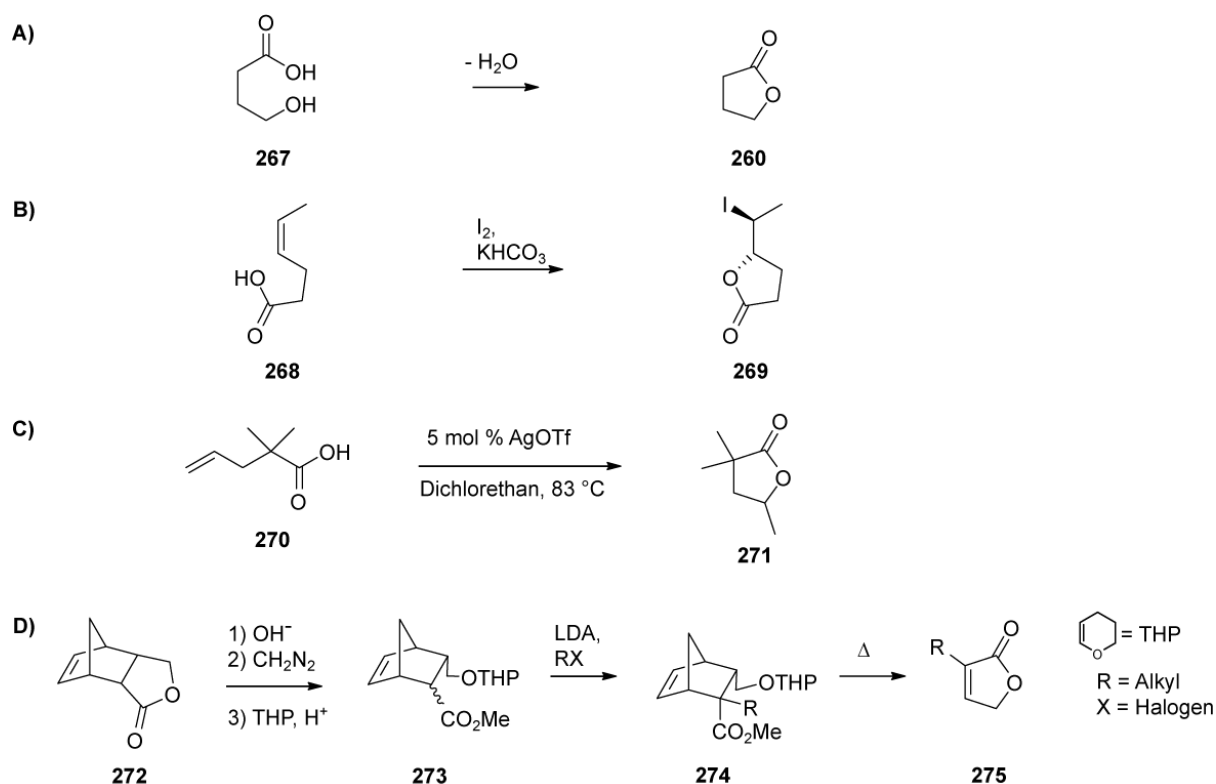


Abbildung 28: Natürlich vorkommende γ -Lactone.

2.1 Lactonsynthese

Ein Weg zur Darstellung von γ -Lactonen ohne Substitution in α -, β -, γ - Position ist die intramolekulare Veresterung von γ -Hydroxybuttersäure (**267**). Diese Reaktion erfolgt säurekatalytisch unter Wasseraustritt zu **260** (Schema 25A) und ist entropisch begünstigt, wobei teilweise die Acidität der Carbonsäure ausreichend ist, um den Ringschluss zu katalysieren.^[211] Eine andere Möglichkeit substituierte γ -Lactone darzustellen ist die Iodlactonisierung (Schema 25B). Diese beinhaltet u. a. die Zyklisierung von γ -Alkensäuren (**268**) unter basischen Bedingungen, die anfangs eine elektrophile Addition von Iod an die Doppelbindung beinhaltet. Über ein Iodonium-Intermediat, gefolgt von einem intramolekularen nucleophilen Angriff des Carboxylats wird das Iodlacton (**269**) ausgebildet.^[212,213] Um eine eventuell notwendige Dehalogenierung zu umgehen, kann Silbertriflat als Katalysator zur Lactonisierung eingesetzt werden. Als Startmaterialien eignen sich γ -Alkensäuren wie 4-Hexensäure (**270**, Schema 25C). Mechanistisch aktiviert das Ag^+ -Ion die Doppelbindung, woraufhin ein O-nucleophiler Angriff erfolgt und das Lacton **271** nach Protonentransfer geliefert wird. Jedoch wurde herausgefunden, dass in Abhängigkeit des Rests an der Doppelbindung einerseits 5-*exo* Zyklisierungen stattfinden und γ -Lactone

liefern oder auch 6-*endo* Zyklisierungen zu den δ -Lactonen katalysiert werden.^[214] Eine individuellere Gestaltung des Substitutionsmusters von γ -Lactonen bietet hingegen ein DIELS-ALDER/ *retro*-DIELS-ALDER Ansatz (Schema 25D). Diese Strategie erlaubt es nach der DIELS-ALDER Reaktion von Maleinsäureanhydrid mit Dicyclopentadien und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid das Lacton **272** auszubilden. Ringöffnung, Veresterung mit Diazomethan und Schützung des Hydroxyrests liefert Ester **273**. Eine folgende Protonenabstraktion mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) erzeugt ein Carbanion, das mit einem Alkylhalogenid abgefangen wird und **274** erzeugt. Der Ringschluss, sowie die *retro*-DIELS-ALDER Reaktion liefert schließlich das α -alkylsubstituierte Butenolid **275**.^[215]



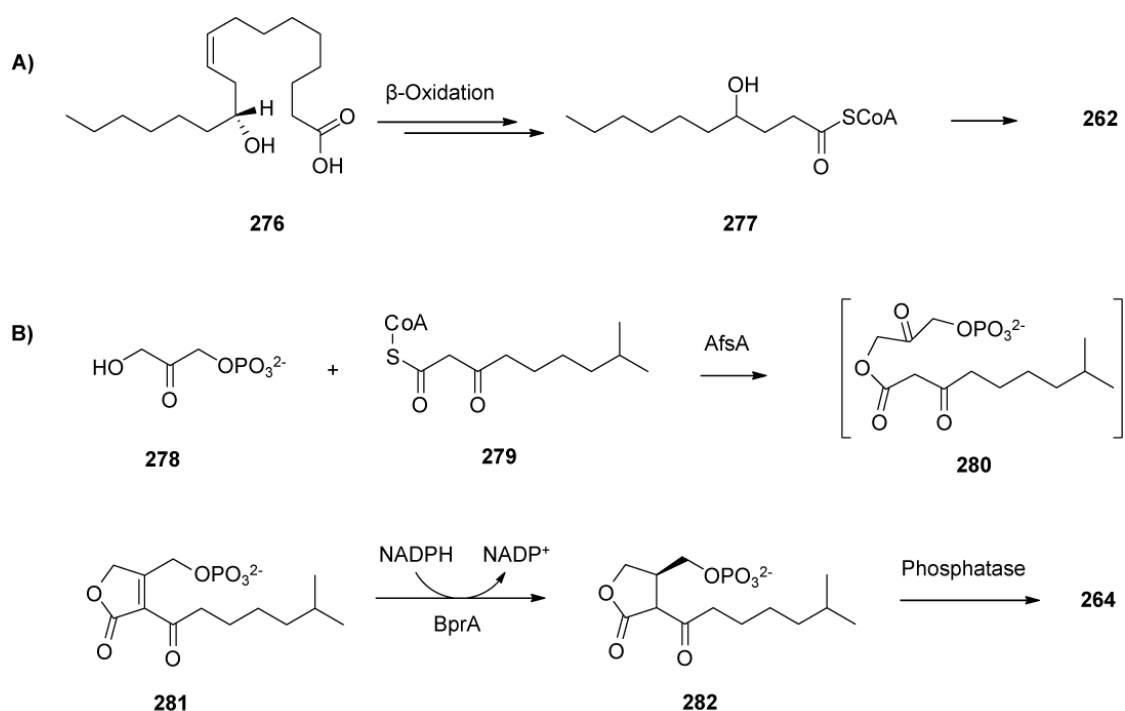
Schema 25: Syntheserouten zu Butanoliden und Butenoliden.

3. Biosynthese von γ -Lactonen

Die γ -Lactone sind von großem Interesse in der Aromaindustrie. Biotechnologisch lässt sich **262** durch die Hefe *Yarrowia lipolytica* darstellen (Schema 26A). *Y. lipolytica* ist in der Lage die 10-Hydroxy- ω -9-Fettsäure Ricinolsäure (**276**) zu **262** zu verstoffwechseln. Biosynthetisch

wird davon ausgegangen, dass nach Kettenverkürzung durch vier β -Oxidationszyklen der 4-Hydroxydecanoyl-CoA-Ester **277** im Sauren zu **262** zyklisiert.^[216]

Die Biosynthese der Autoregulatoren (vgl. Schema 26B) wie **264** hingegen startet mit der Bildung des β -Keto-acyl-CoA-thioester **279** aus einer Isovaleryl-CoA-Einheit und zwei Malonyl-Verlängerungseinheiten durch eine Polyketidsynthese. In einer Kondensationsreaktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP, **278**) und **279** wird unter Katalyse von dem Enzym AfsA der Ester **280** geliefert. Anschließend intramolekulare KNOEVENAGEL Reaktion erbringt das Butenolid **281**, das im nächsten Schritt stereospezifisch mit Hilfe von BprA und unter Verwendung von NADPH als Protonendonator zu dem γ -Butyrolacton **282** umgesetzt wird. Dephosphorylierung im letzten Schritt liefert den Autoregulator **264**.^[207,217]



Schema 26: Biosynthese von γ -Lactonen.

4. Flüchtige Duftstoffe aus *Geniculosporium* sp. 9910

Bereits von den Agarplatten des endophytischen Pilzes *Geniculosporium* sp. 9910 konnte ein minzig frischer Duft wahrgenommen werden, was den Anlass für eine genauere Analyse lieferte.^[36] Das Duftstoffprofil der flüchtigen Verbindungen wurde wiederum mittels der CLSA-Methode durchgeführt. Die anschließende GC-MS-Analyse lieferte das Totalionenchromatogramm zu sehen in Abbildung 29.

Der Headspace-Extrakt scheint überschaubar zusammengesetzt zu sein. Die Hauptproduktion des Pilzes entfällt auf die Verbindung **A**, die von zwei NebenkompONENTEN begleitet ist (**B** und **C**). Weiterhin zeigen sich noch einige oxigenierte Sesquiterpene, die aber nicht weiter identifiziert wurden.

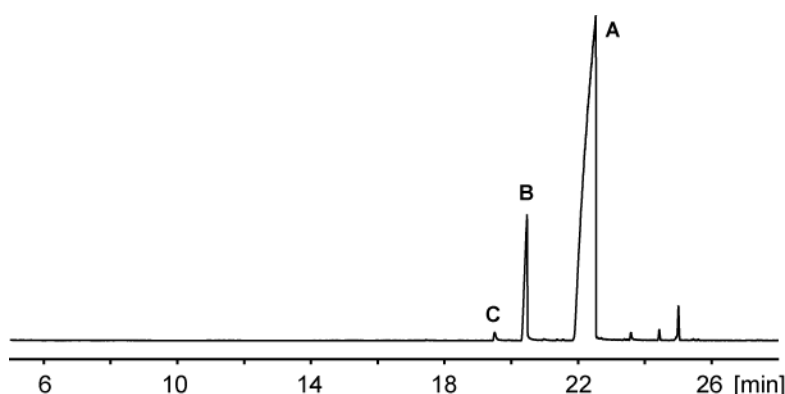


Abbildung 29: Totalionenstrom des CLSA-Extrakts von *Geniculosporium* 9910.

Die Komponenten **A**, **B** und **C** weckten das Interesse dadurch, dass die Massenspektren in den zur Verfügung stehenden Datenbanken nicht zu finden war. Das Massenspektrum der Hauptkomponente zeigt ein Molekülion bei $m/z = 154$ (vgl. Abbildung 30 links) und einem Basispeak mit einer Masse von $m/z = 112$. Aus zuvor publizierten Daten konnte die Struktur von 2-Butyl-3-methylbut-2-enolid (**283**) aus Extrakten von *Hypoxylon serpens*^[218] sowie von endophytischen Pilzen von *Picea glauca* (Weissfichte)^[219] massenspektrometrisch und NMR spektroskopisch nachgewiesen werden. Diese besitzt die Summenformel $C_9H_{14}O_2$ und zeigt entsprechend ein Molekülion von $m/z = 154$. Ein Vergleich der Massenspektren der

publizierten Daten mit dem Massenspektrum der gesuchten Substanz zeigte, dass es sich um die gesuchte Verbindung handeln könnte.

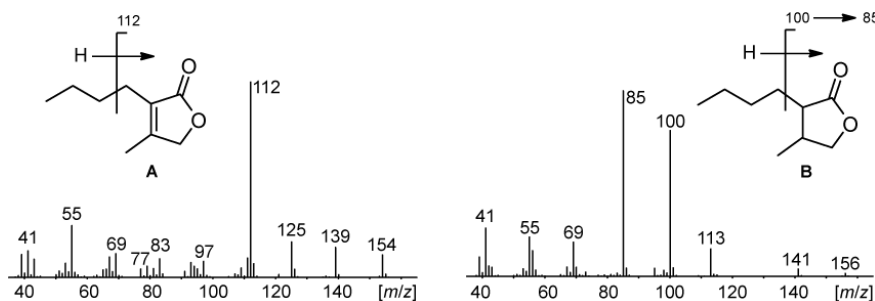


Abbildung 30: Massenspektren der Verbindungen **A** (links) und **B** (rechts).

Desweiteren finden sich im Totalionenstrom des Headspaceextrakts von *Geniculosporium* die Verbindungen **B** und **C**, die bei unterschiedlichen Retentionsindices (**B**, $I = 1300$; **C**, $I = 1272$) die gleichen Massenspektren aufweisen. Ein Massenspektrum ist in Abbildung 30 rechts dargestellt. Diese Verbindungen besitzen ein Molekülion von $m/z = 156$ entsprechend einer Molekülmasse von zwei Wasserstoffatomen mehr als **A**. Somit berechnen sich die Summenformeln der unbekannten Substanzen zu $C_9H_{16}O_2$, was möglicherweise die Reduktionsprodukte von **A** *cis*- und *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolid (*cis*-**284** und *trans*-**285**) darstellen könnte. Die markantesten Fragmentierungsionen zeigen sich bei Verbindung **A** im Basispeak mit $m/z = 112$, sowie bei den Massenspektren der Isomere **B** und **C** bei $m/z = 100$ und dem Basispeak mit $m/z = 85$.

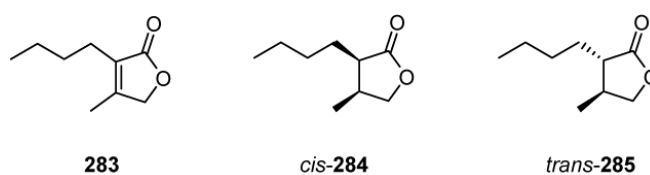
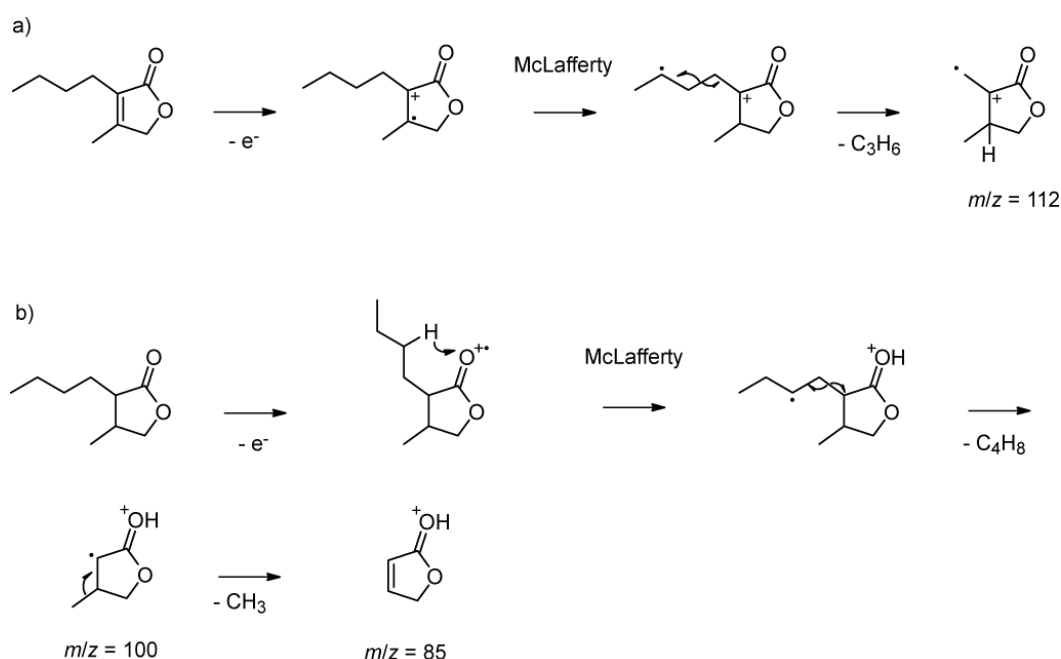


Abbildung 31: Vermutete Strukturen der Verbindungen **A**, **B** und **C**.

Die unterschiedlichen Fragmentierungen der Verbindungen lassen sich in beiden Fällen durch eine McLafferty Umlagerung erklären (Schema 27).^[36] Das Fragmention des Basispeaks bei $m/z = 112$ der Verbindung **A** könnte dadurch entstehen, dass durch anfängliche Entfernung des π -Elektrons an Position 2 das Molekülion erzeugt wird. McLafferty Umlagerung und abschließende allylische Abspaltung liefert den Basispeak mit $m/z = 112$ (Schema 27a). Das Molekülion der Isomere **B** und **C** könnte durch Entfernung des Elektrons an der Carbonylgruppe erzeugt werden, γ -H-Abspaltung und McLafferty Umlagerung liefert nach

Abspaltung von Buten das Fragmentation mit der Masse $m/z = 100$. Anschließende Methylabspaltung erzeugt das Fragmentation des Basispeaks mit $m/z = 85$ (Schema 27b).^[36] Die Ähnlichkeit der Massenspektren der Verbindungen **B** und **C** ließ zwar den Rückschluss zu, dass es sich um *cis-trans*-Isomere handeln könnte, jedoch konnten durch die Unterschiede im Retentionsverhalten keine strukturellen Unterschiede abgeleitet und somit das jeweilige Diastereomer bestimmt werden. Daher wurde eine Synthese aller drei Verbindungen geplant, um die Identifizierung zu ermöglichen. Dabei wurde von einem Ansatz ausgegangen, der alle drei Verbindungen in einer Syntheseroute zugänglich machen sollte.

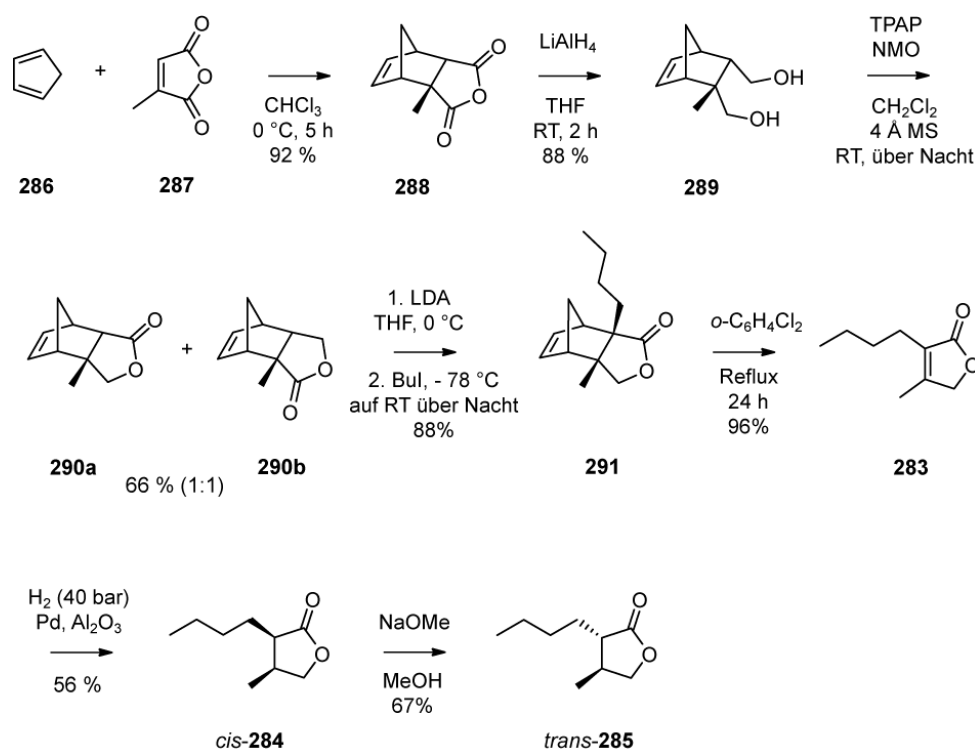


Schema 27: Mögliche MS Fragmentierungsmechanismen von a) Verbindung A und b) Verbindung B.^[36]

4.1 Synthese flüchtiger Verbindungen aus *Geniculosporium*

Die vermutete hohe Flüchtigkeit der Substanzen **283**, **284** und **285** gab Anlass dazu die Synthese bis zum ersten Zielmolekül aus nicht flüchtigen Verbindungen zu gestalten. Um dieser Flüchtigkeit zu entgehen und eine bessere Handhabbarkeit der Zwischenstufen zu gewährleisten, wurde auf eine DIELS-ALDER/*retro*-DIELS-ALDER Synthesemethode zurückgegriffen (Schema 28). Diese startete mit einer DIELS-ALDER Reaktion von

Citraconsäureanhydrid (**287**) mit Cyclopentadien (**286**), wobei das DIELS-ALDER Produkt in sehr guter Ausbeute mit 92 % erhalten wurde. Das Anhydrid **288** wurde in der folgenden Reaktion mit LiAlH_4 in akzeptabler Ausbeute (88 %) zum Diol **289** reduziert. Im nächsten Schritt erfolgte eine LEY-Oxidation mit Tetrapropylammoniumperruthenat (TPAP) und *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) zu den regioisomeren Lactonen **290a** und **290b** in einem 1:1 Regioisomerenverhältnis mit 66 % Ausbeute. Die Isomere **290a** und **290b** konnten säulenchromatographisch nicht voneinander getrennt werden und das Gemisch wurde ohne weitere Aufreinigung für die folgende Umsetzung verwendet. Es folgten Deprotonierung mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) und anschließende Alkylierung mit Butyliodid. Dabei reagierte lediglich das Regioisomer **290a** zu **291**, wodurch **290b** vom Alkylierungsprodukt säulenchromatographisch abgetrennt wurde. Um zum ersten Zielmolekül **283** zu gelangen bedurfte es lediglich einer *retro*-DIELS-ALDER-Reaktion, die in refluxierendem *o*-Dichlorbenzol für 24 Stunden durchgeführt wurde. Dabei konnte 2-Butyl-3-methylbut-2-enolid (**283**) mit 96 % Ausbeute (23 % über alle Stufen) erhalten werden.

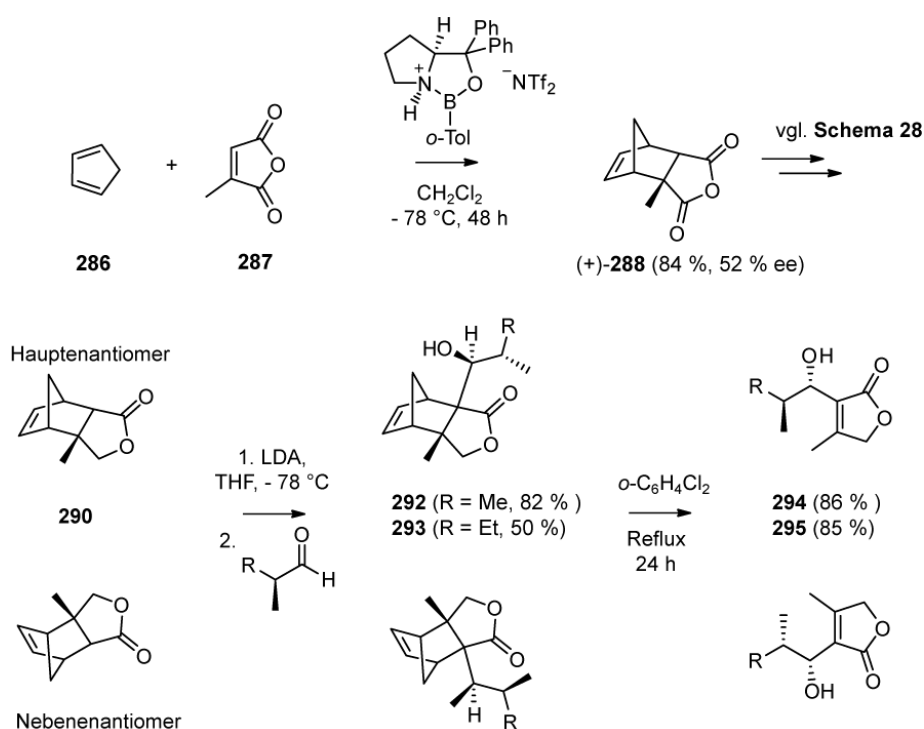


Schema 28: Syntheseroute der flüchtigen Verbindungen aus *Geniculosporium* sp..

Das erste Zielmolekül **283** wurde folgend in einer *cis*-selektiven Hydrierung unter Katalyse von Palladium auf Aluminiumoxid (Al_2O_3) zu *cis*-2-Butyl-3-methylbutanolid (**284**) umgesetzt. Im letzten Schritt erfolgte Isomerisierung von **284** mit Natriummethoxid (NaOMe), was *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolid (**285**) lieferte. Alle der drei synthetisierten Referenzen (**283-285**) konnten durch Vergleich der Massenspektren und Retentionsindices als Naturstoffe von *Geniculosporium* bestätigt werden. Die bevorzugt produzierte Verbindung **A** von *Geniculosporium* ist das Butenolid **283**. Im Falle der diastereomeren Butanolide **284** und **285** zeigte sich, dass *trans*-**285** vor *cis*-**284** eluierte. Die gesuchte Minorkomponente **B** kann als Verbindung *cis*-**284** und Komponente **C** als *trans*-**285** identifiziert werden.

4.2 Enantioselektive Synthese von Signalverbindungen

In einem ähnlichen Ansatz sollte die Möglichkeit getestet werden, das Lacton **290** als Templat für eine enantioselektive Synthese von Lactonen zu verwenden. Da jedoch der Syntheseansatz zu den chiralen Verbindungen *cis*-**284** und *trans*-**285** aus *Geniculosporium* sp. 9910 über die achirale Verbindung **283** verläuft, wurden die bioaktiven Signalmoleküle (-)-**294** und (-)-**295** aus *Streptomyces antibioticus* Tü 99 ausgewählt, um die neue Methode zur enantioselektiven Synthese anzuwenden. Die Verbindungen (-)-**294** und (-)-**295** konnten bereits über eine enantioselektive Syntheseroute unter Verwendung von (-)-Menthol als chirales Auxilliar dargestellt werden.^[220,221] COREY und Mitarbeiter veröffentlichten eine enantioselektive DIELS-ALDER Reaktion von Citraconsäureanhydrid mit Cyclopentadien unter Einsatz eines chiralen Oxazaborolidinkatalysators.^[222] Dies eröffnete die Möglichkeit das Templat **290** enantioselektiv zu synthetisieren, wie es für die Darstellung von (-)-**294** und (-)-**295** notwendig ist. Der erforderliche Oxazaborolidinkatalysator ist kommerziell erhältlich und die enantioselektive DIELS-ALDER Reaktion lieferte (+)-**288** mit einem Enantiomerenüberschuss von 52 % *ee* (im publizierten Ansatz wurden 92 % *ee* berichtet, vgl. Schema 29).^[222]



Schema 29: Enantioselective Synthese der Signal Verbindungen (-)-286 und (1*S*,2*S*)-287 aus *Streptomyces antibioticus*.

Der Enantiomerenüberschuss wurde mittels GC auf einer chiralen stationären Phase überprüft (vgl. Abbildung 32 a und b). Das DIELS-ALDER Produkt (+)-288 wurde analog zur Synthese der racemischen Verbindung 290 (Schema 29) in die enantiomeren angereicherte Substanz (+)-290 überführt. Deprotonierung von (+)-290 mit LDA und Addition mit Isobutyraldehyd liefert 292 als einziges Diastereomer, das nach der *retro*-DIELS-ALDER Reaktion (-)-294 hervorbringt. GC-Analyse auf einer chiralen stationären Phase zeigt einen Enantiomerenüberschuss von 56 % *ee* für (-)-294 (Abbildung 32 c und d) und liegt somit in einem gleichen Bereich wie das DIELS-ALDER Produkt (+)-288. Die hohe Diastereoselektivität wird durch die Ausbildung eines sechsgliedrigen Übergangszustand diskutiert (Abbildung 33).^[36] Es wird davon ausgegangen, dass das Esterenolat 290 von dem Aldehyd von der konvexen Seite angegriffen wird. Dabei zeigt das Wasserstoffatom des Aldehyds zwischen die Brückenmethyleneneinheit des Norbornensystems und die große Alkylgruppe zeigt weg von dem System. Folglich greift der Aldehyd das Hauptenantiomere 290 von der *Re* Seite an. Stereochemisch ist der daraus neu entstandene sekundäre Alkohol *S* konfiguriert (für R = Alkyl).^[36]

Auf ähnliche Weise entsteht aus dem enantiomeren angereicherten (+)-**290** in der Reaktion mit (*S*)-2-Methylbutyraldehyd die Verbindung **293**, die nach *retro*-DIELS-ALDER Reaktion in (-)-**295** resultiert. Die Reaktion zu **295** verläuft mit hoher Diastereoselektivität (45 % *de*). Dabei entstehen zwei Diastereomere, wobei das erste eine (1*S*,2*S*)-konfigurierte 1-Hydroxy-2-methylbutylseitenkette, das aus der Reaktion mit dem Hauptenantiomer von **290** entsteht und das zweite mit einer (1*R*,2*S*)-konfigurierten Seitenkette aus der Reaktion mit dem Nebenenantiomer von **290** resultierend. Die *retro*-DIELS-ALDER Reaktion von **289** liefert folglich eine Mischung der diastereomeren Butenolide (1*S*,2*S*)-**295** und (1*R*,2*S*)-**287** mit einem diastereomeren Überschuss von 45 % *de* (Abbildung 32 e und f) und somit ähnlich dem enantiomeren Überschuss wie für das DIELS-ALDER Produkt **288**. Die Syntheseroute zu (1*SR*,2*S*)-**295** wurde ebenfalls aus dem Racemat von **293** mit (*S*)-2-Methylbutyraldehyd durchgeführt. Nach der *retro*-DIELS-ALDER Reaktion des racemischen Gemisches von **293** wurde eine 1:1 Mischung der Diastereomere von **295** erhalten (Abbildung 32 e).

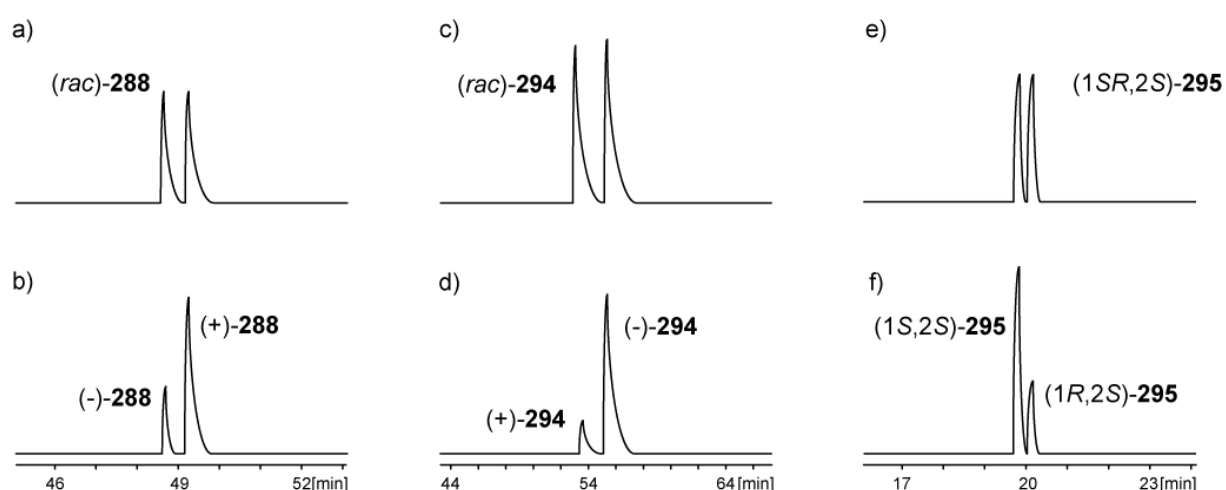


Abbildung 32: Gaschromatogramme von a) (*rac*)-**288** und b) angereichertem Enantiomer (+)-**288**, gemessen auf einer Lipodex G Kapillarsäule, c) (*rac*)-**294** und d) angereichertem Enantiomer (-)-**294**, gemessen auf einer chiralen Hydrodex Kapillarsäule, e) (1*SR*,2*S*)-**295** erhalten aus (*rac*)-**288** und f) (1*S*,2*S*)-**295** aus enantiomer angereichertem (+)-**288** gemessen auf einer chiralen Hydrodex Kapillarsäule. Die Trennung der Diastereomere wurde auf einer chiralen Säule durchgeführt, da keine Trennung auf einer HP5-MS Kapillarsäule erreicht wurde. Die ^1H - und ^{13}C -NMR spektroskopischen Analysen zeigten, dass die zwei Peaks der Chromatogramme e) und f) verschiedene Diastereomere repräsentieren und kein Enantiomerenpaar.

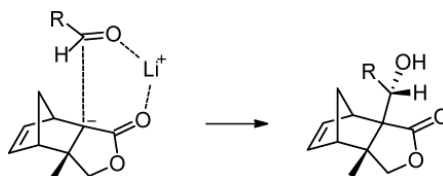


Abbildung 33: Möglicher sechsgliedriger Übergangszustand Anordnung für die Reaktion des Esterenolats von **290** mit Aldehyden.^[36]

Insgesamt weist die aufgezeigte Syntheseroute hohe Diastereoselektivität auf, was sich in der Bildung von zwei Enantiomeren von **294** mit einem Enantiomerenüberschuss von 56 % *ee*, sowie in der Diastereoselektivität der Reaktion zu **295** mit einem Diastereomerenüberschuss von 45 % *de* widerspiegelt. In beiden Fällen ist der Enantiomerenüberschuß des DIELS-ALDER-Produkts (+)-**288** (52 % *ee*) im Rahmen der Messgenauigkeit in den weiteren Stufen übertragen worden. Ein höherer Enantiomerenüberschuß von **294**, sowie ein höherer Diastereomerenüberschuss von **295** kann somit durch eine Verbesserung der Enantioselektivität des DIELS-ALDER Addukts (+)-**288** gewährleistet werden.

5. Lactone aus *Geniculosporium* sp.

Es konnten drei flüchtige Lactone aus dem Headspace-Extrakt des endophytischen Pilz *Geniculosporium* sp. 9910 gefunden werden, die sich nach Synthese der Referenzen als 2-Butyl-3-methylbut-2-enolid (**283**), sowie die gesättigten Isomere *cis*-2-Butyl-3-methylbutanolid (**284**) und *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolid (**285**) herausstellten. Die Synthese dieser Verbindungen wurde über einen DIELS-ALDER/*retro*-DIELS-ALDER Ansatz ausgehend von Citraconsäureanhydrid und Dicyclopentadien durchgeführt. Die Reduktion des DIELS-ALDER-Produkts lieferte die regioisomeren Lactone **290a** und **290b**, die nach α -Alkylierung und folgender *retro*-DIELS-ALDER-Reaktion das 2,3-disubstituierte Butenolid hervorbrachte. Folgende Hydrierung und Isomerisierung machte schließlich die *cis/trans*-Isomere **284** und **285** zugänglich und es wurden somit aus einer Syntheseroute drei Zielmoleküle erhalten. Aus einer bereits publizierten enantioselektiven DIELS-ALDER-Reaktion^[222] konnte die stereoselektive Synthese zu den Signalmolekülen **294** und **295** aus *Streptomyces antibioticus* weiterentwickelt werden. Als Schlüsselschritt wurde das enantiomeren angereicherte Lacton **290a** mit Aldehyden mit hoher Diastereoselektivität alkyliert. Es konnte gezeigt werden, dass der anfängliche Enantiomerenüberschuss der DIELS-ALDER Reaktion zu (+)-**288** in den folgenden Stufen übertragen worden ist.

VI. *Bradyrhizobium japonicum*

Heterologe Expression der an der Gibberellinsäurebiosynthese beteiligten P450-Monooxygenasen

1. Das Rhizobakterium *Bradyrhizobium japonicum*

Das Bodenbakterium *Bradyrhizobium japonicum* ist ein gramnegatives Alphaproteobakterium und gehört zu der Familie der *Rhizobiaceae* (Knöllchenbakterien). Diese Bakterien besiedeln die Rhizosphäre von Pflanzen und vermindern durch verschiedene Mechanismen den Einfluss von Schädlingen oder stellen Nährstoffe bereit und haben einen förderlichen Effekt auf das Pflanzenwachstum.^[223] Vorwiegend werden Rhizobakterien in Symbiose mit Leguminosen wie *Glycine max* (Sojabohne) oder auch Lupinen (*Lupinus*) angetroffen. In nährstoffarmen Böden lebt die Symbiose von der Knöllchenbildung der Bakterien, sodass z.B. Stickstoff fixiert wird und als Nahrungsquelle für die Pflanze bereit steht.^[224–226] Als Stickstoffquelle kann sowohl Nitrat als auch Ammonium verstoffwechselt werden.^[227] Neben der Stickstofffixierung ist *B. japonicum* auf die Produktion weiterer Sekundärmetabolite (vgl. Abbildung 34) untersucht worden. Dabei konnten die Phytohormone Indol-3-essigsäure (**296**), das Cytokin Zeatin (**297**), Abscinsäure (**298**), sowie Gibberelline (**115**), die für das Längenwachstum der Pflanze verantwortlich sind, identifiziert werden.^[223,228]

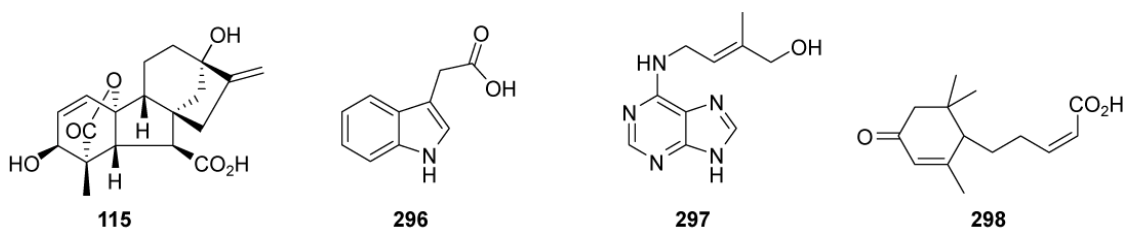


Abbildung 34: Phytohormone produziert von *B. japonicum*.

2. Die Biosynthese von Gibberellinen in Pflanzen und Pilzen

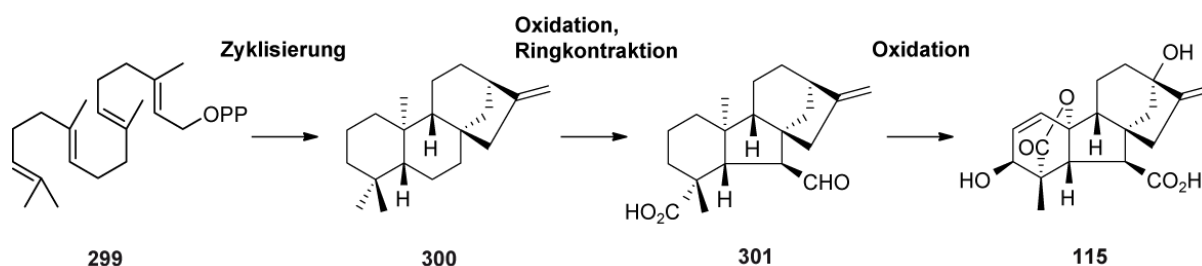
Gibberelline sind Pflanzenhormone, die der Gruppe der Diterpene angehören und zu einem tetrazyklischen System verbunden sind. Bis heute sind 136 verschiedene Gibberelline isoliert worden, von denen etwa 30 % biologisch aktiv sind, während die anderen 70 % Vorstufen oder deaktivierte Metabolite darstellen.^[229] Die Bezeichnung erfolgt in chronologischer Reihenfolge ihrer Entdeckung von GA₁-GA₁₃₆. In der Pflanze übernehmen Gibberelline zusammen mit anderen Pflanzenhormonen die Regulation des Längenwachstum, die Blüten- und Fruchtbildung.^[93,230] Es konnte gezeigt werden, dass genetisch bedingter Zwergenwuchs bei Maispflanzen (*Zea mays*) und Erbsensprösslingen (*Pisum sativum*) durch die Zugabe von Gibberellinen aufgehoben wird. Daraus wurde geschlossen, dass der Zwergenwuchs durch ein

Defekt eines Enzyms zur Gibberellinbiosynthese verursacht wurde.^[230,231] Andererseits wurde festgestellt, dass ein Überfluss an Gibberellinen, verursacht durch die Abgabe der Hormone über phytopathogene Pilze, zu einem abnormen Längenwachstum führt.

Die externe Gabe von Gibberellinen ist besonders für die Landwirtschaft und dem Obstbau von Interesse, wo z.B. bei Erdbeeren durch die Anwendung von Gibberellinen die Blüten- und Fruchtbildung erhöht wird. Weiterhin finden Gibberelline Einsatz im Anbau von Kirschen, Weintrauben, Zitrusfrüchten, Kartoffeln oder auch Tomaten. Die Verzögerung des Alterungs- und Reifeprozess oder die Resistenz gegen Pathogene wurden in Früchten nach der Ernte durch die Behandlung mit Gibberellinen positiv beeinflusst.^[93,232]

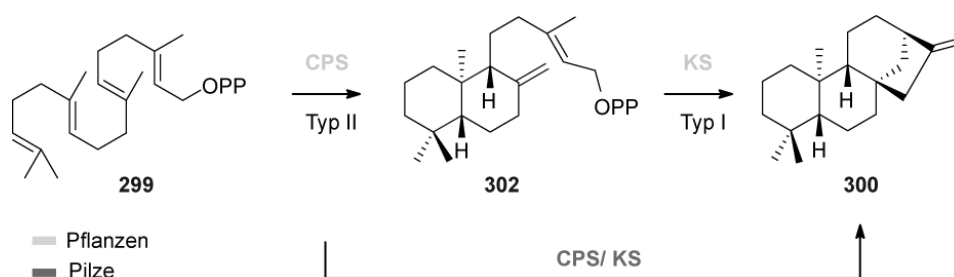
Gibberelline sind in jeder Pflanze vertreten. Pilze wie *G. fujikuroi* sind durch ihre Gibberellinbildung bekannt geworden. Aber auch aus Bakterien wie *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*^[233], *Azospirillum lipoferum*^[234], *Rhizobium phaseoli*^[235] sowie *Bradyrhizobium japonicum*^[228] konnten Gibberelline isoliert werden.

Während die Biosynthese von Gibberellinen in Pflanzen und Pilzen aufgeklärt ist, bleibt die Synthese der Phytohormone durch Bakterien noch offen, dessen Verständnis zu neuem biotechnologisch wertvollem Nutzen führen könnte.^[232] Die Gibberellinbiosynthese kann in drei maßgebliche Schritte eingeteilt werden (Schema 30). Im ersten Schritt erfolgt eine Zyklisierung von Geranylgeranyldiphosphat (**299**) zum tetrazyklischen *ent*-Kauren (**300**). Anschließende Oxidation sowie Ringkontraktion liefert GA₁₂-Aldehyd (**301**) und folgende Oxidationsreaktionen liefern die Gibberelline wie **115**.



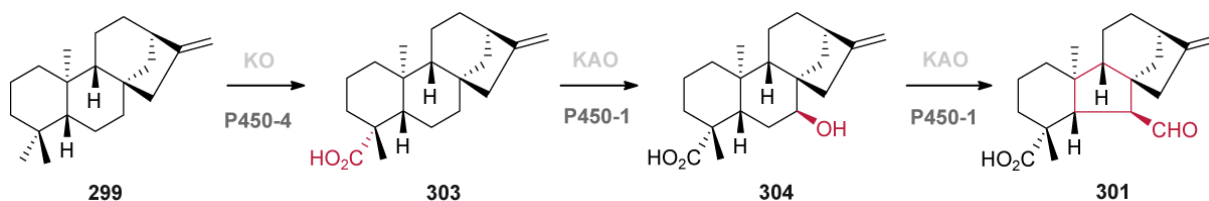
Schema 30: Übersicht zur Bildung von Gibberellinen.

In Pflanzen wird zunächst *ent*-Copalyldiphosphat (**302**) unter Katalyse der Copalylsynthase (CPS) gebildet (Schema 31). Die Kaurensynthase (KS) liefert unter Ringschluss **300**. Während die pflanzliche Zyklisierung von den zwei Terpenzyklasen CPS und KS übernommen wird, besitzen Pilze eine bifunktionale Terpenzyklase (CPS/KS), die beide Schritte der Zyklisierung von **299** zu **300** katalysiert.^[94,229]

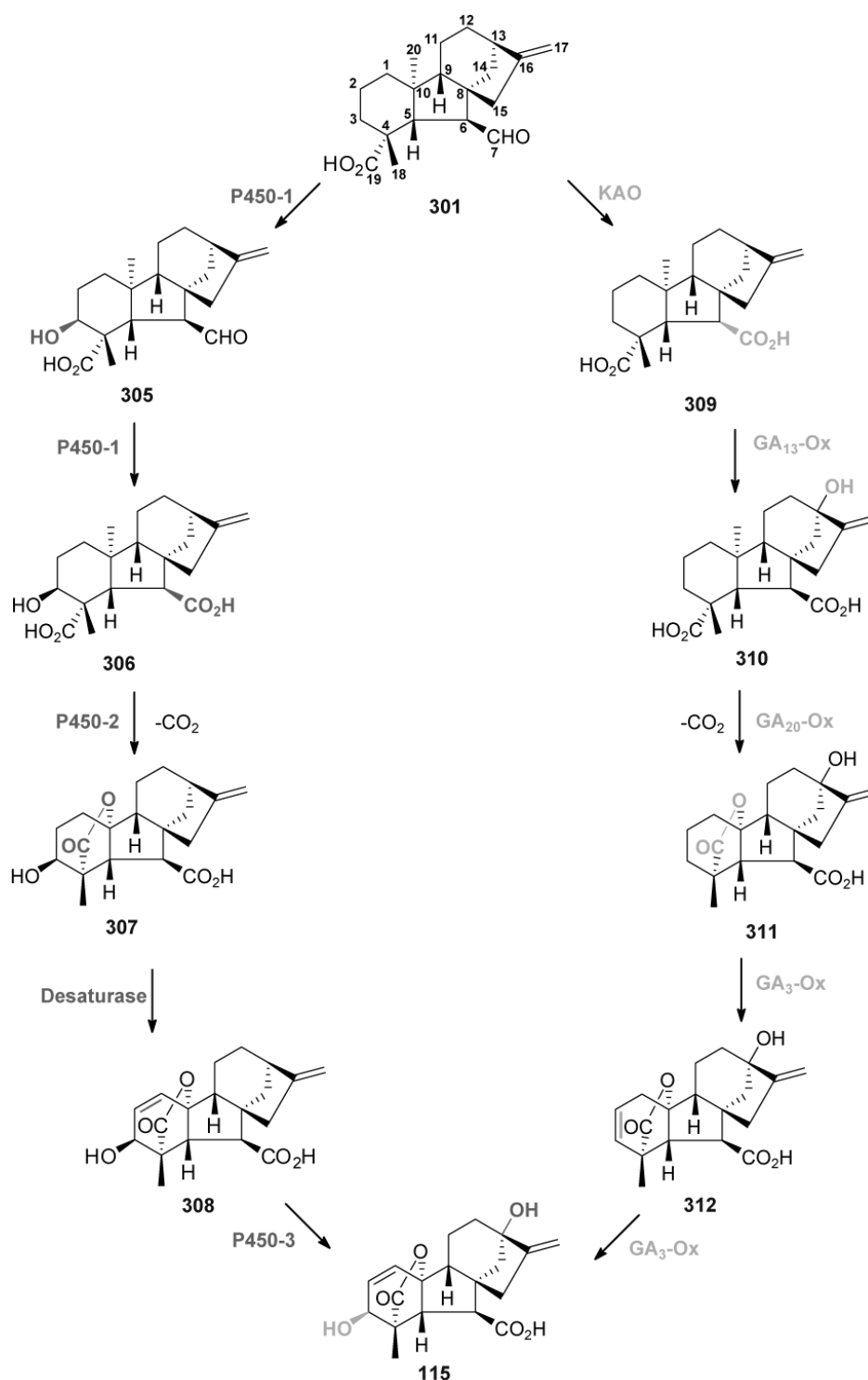


Schema 31: Biosynthese von *ent*-Kauren (**300**) in Pflanzen (hellgrau) und Pilzen (dunkelgrau).

Die Folgereaktionen zu **301** (Schema 32) verlaufen in Pflanzen und Pilzen gleich. Im ersten Schritt wird **300** zu *ent*-Kaurensäure (**303**) oxidiert. Katalysiert wird die Reaktion durch Cytochrom P450 Monooxygenasen. In *Arabidopsis thaliana* z.B. ist dies eine *ent*-Kauren-Oxidase (KO) und in *G. fujikuroi* ist P450-4 beteiligt. Durch eine 7- β -Hydroxylierung wird eine Alkoholfunktion wiederum unter Katalyse einer Cytochrom P450 Monooxygenase eingeführt und liefert *ent*-7 α -Hydroxykaurensäure (**304**). Das gleiche Enzym katalysiert schließlich auch die Kontraktion des B-Rings zu dem Aldehyd **301**. In Pflanzen sind für diese Reaktion eine *ent*-Kaurensäure-Oxidase (KAO) und in Pilzen die P450-1 verantwortlich.



Schema 32: Biosynthese von GA₁₂-Aldehyd in Pflanzen (hellgrau) und Pilzen (dunkelgrau).



Schema 33: Biosynthese der aktiven Form GA₃ in Pflanzen (rechter Weg) und *G. fujikuroi* (linker Weg).

Die Weiterreaktionen zu dem aktiven Gibberellin GA₃ unterscheiden sich in Pilzen und Pflanzen (Schema 33). Der Aldehyd **301** aus Pilzen wird in 3 β -Position durch P450-1 hydroxyliert und liefert den GA₁₄-Aldehyd (**305**), während die KAO aus *A. thaliana* die Oxidation des Aldehyds katalysiert und GA₁₂ (**309**) hervorbringt. Fortan wird **305** in Pilzen

unter Verlust eines Kohlenstoffatoms von dem multifunktionalen Cytochrom P450 über GA₁₄ (**306**) zu GA₄ (**307**) transformiert. Die aktive Form GA₃ (**115**) wird schließlich durch eine Desaturase-Reaktion, die eine Doppelbindung in Position 1 einführt und damit GA₇ (**308**) liefert und durch abschließende 13-Hydroxylierung zu **115** mittels einer Cytochrom P450 geliefert. In Pflanzen wird **300** durch eine GA₁₃-Ox Monooxygenase an Position 13 hydroxyliert und in GA₅₃ (**310**) überführt. Eine glutaratabhängige Dioxigenase (GA₂₀-Ox) oxidiert Position 20 in **310** und liefert unter Verlust eines Kohlenstoffatoms das Lacton GA₂₀ (**311**). Eine GA₃-Oxidase führt eine Doppelbindung ein und hydroxyliert in Position 3, sodass über GA₅ (**312**) die aktive Form **115** ausgebildet wird. Während in Pflanzen sieben Gene, die für die Gibberellinbiosynthese verantwortlich sind, über das ganze Genom verteilt sind, wurden in Pilzen lediglich fünf Gene, die für die Gibberellinsynthese codieren als Cluster identifiziert.^[94,229]

3. Heterologe Expression der P450-Monooxygenasen und Ferredoxin aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

Der Biosyntheseweg von Gibberellinen konnte in Pflanzen und Pilzen aufgeklärt werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich der gemeinsame Weg nach der Terpenicyclisierung zu *ent*-Kauren und anschließender Oxidation zum GA₁₂-Aldehyd spaltet und folgende Oxidationen zu den mannigfaltigen Gibberellinen sich in Pflanzen und Pilzen unterschiedlich gestaltet (vgl. Abschn. 2).

Ein Nachweis von Gibberellinen, die bakteriell gebildet wurden, konnte aus Rhizobakterien^[228,234,235] bereits erbracht werden. *Rhizobium phaseoli* und *B. japonicum* z. B. produzieren bis zu 1 mg L⁻¹ Gibberelline.^[228,235] Das komplette Genom von *B. japonicum* USDA 110 wurde sequenziert^[236] und enthält ein Biosynthesegencluster, dass für die Biosynthese von Gibberellinen codiert (Abbildung 35).^[237] Die Aufklärung nachgeschalteter Schritte zur Gibberellinbiosynthese in *B. japonicum* USDA 110 sollte mittels heterologer Expression der vermutlich beteiligten Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP112, CYP114 sowie CYP117 unter Beteiligung einer Ferredoxin Reduktase und des Ferredoxins ausgehend

vom Substrat *ent*-Kauren durchgeführt werden. Dafür wurden die Gene, die für die Monooxygenasen, das Ferredoxin sowie die Ferredoxin Reduktase codieren in ein Vektorsystem kloniert, heterolog exprimiert und aufgereinigt.

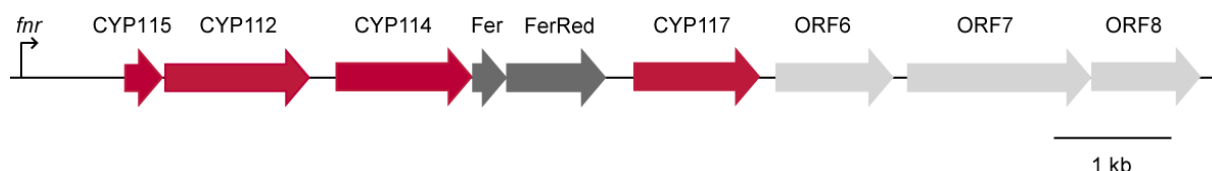


Abbildung 35: Gibberellin-Biosynthesegencluster in *B. japonicum* USDA 110.

3.1 Klonierungsstrategie

Im ersten Schritt der Klonierung wurden die entsprechenden Genabschnitte der genomischen DNA von *B. japonicum* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (vgl. Abbildung 36). Die PCR-Produkte sowie der zuvor ausgewählte Vektor pMal-c5X wurden anschließend mit Restriktionsendonucleasen geschnitten. Anschließend wurden linearisierter Vektor sowie das verdaute Insert unter Katalyse einer T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Die auf diese Weise erhaltenen Vektor-Insert-Konstrukte wurden in elektrokompente Zellen des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Nach erfolgreicher Transformation wurden die Zellen auf LB-Agar mit Ampicillin-Zusatz selektiv vermehrt. Die Prüfung positiver Klone auf die richtige Größe des Vektor-Insert-Konstrukts wurde mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Der korrekte Einbau des Inserts wurde nach der Plasmidisolierung mittels Sequenzierung überprüft.

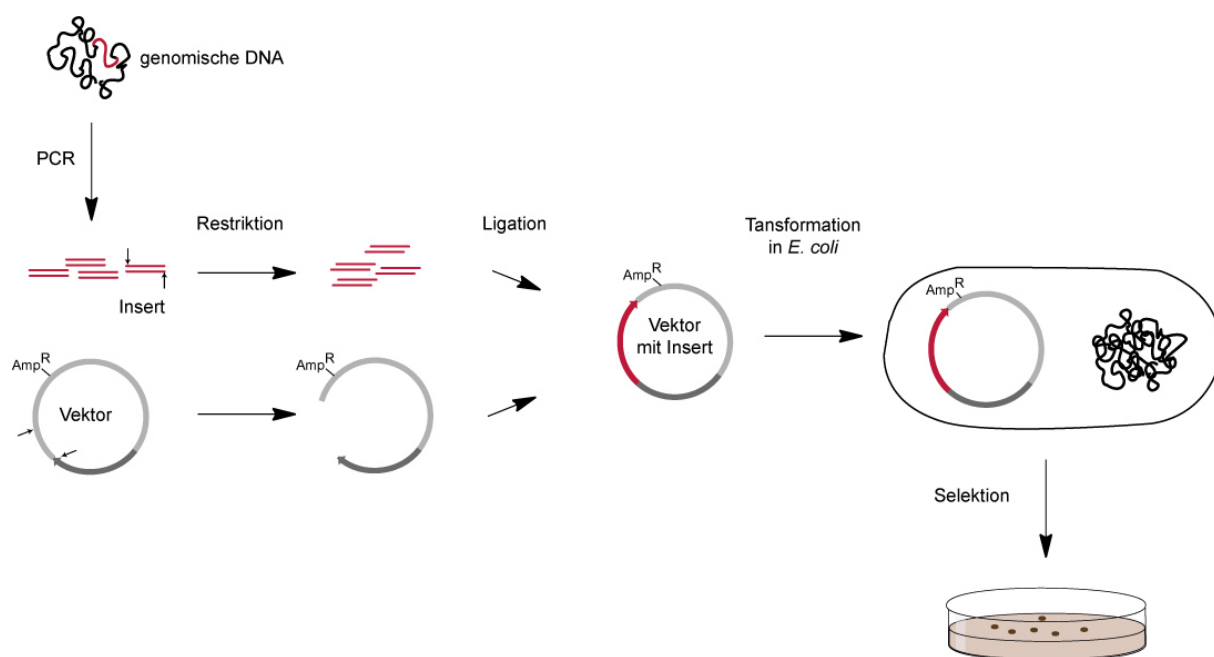


Abbildung 36: Klonierungsstrategie zur Erstellung von Vektor-Insert-Konstrukten.

3.2 Das pMal-c5X Klonierungs- und Expressionssystem

Für die Klonierung und die anschließende heterologe Expression der Enzyme wurde der pMal-c5X-Vektor (Abbildung 37A) ausgewählt. Dieser besitzt ein *malE* Gen aus *E. coli*, das für ein Maltose-bindendes Protein (MBP) codiert.^[238,239] Das amplifizierte Gen wird dem *malE* Gen nachgeschaltet inseriert (Abbildung 37B), so dass nach Expression ein Fusionsprotein entsteht. Der Vektor trägt weiterhin ein *lacI* Gen, welches für den Lac Repressor codiert. Der Lac Repressor sorgt dafür, dass der Ptac Promoter in Abwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) nicht exprimiert wird. Ferner ist der pMal-c5X Vektor mit einer Sequenz ausgestattet, die für eine Erkennungsstelle für den Blutkoagulationsfaktor Xa codiert. Diese Protease schneidet während des Gerinnungsprozess Prothrombin spezifisch am Tetrapeptid Ile-Glu-Gly-Arg und entlässt Thrombin.^[239] Die Gensequenz, die für Faktor Xa codiert, befindet sich am C-Terminus des *MalE* Gen im Polylinker der Multiple cloning site (MCS), sodass das N-terminale Zielprotein durch die Protease nach dem Reinigungsprozess abgespalten werden kann.^[240]

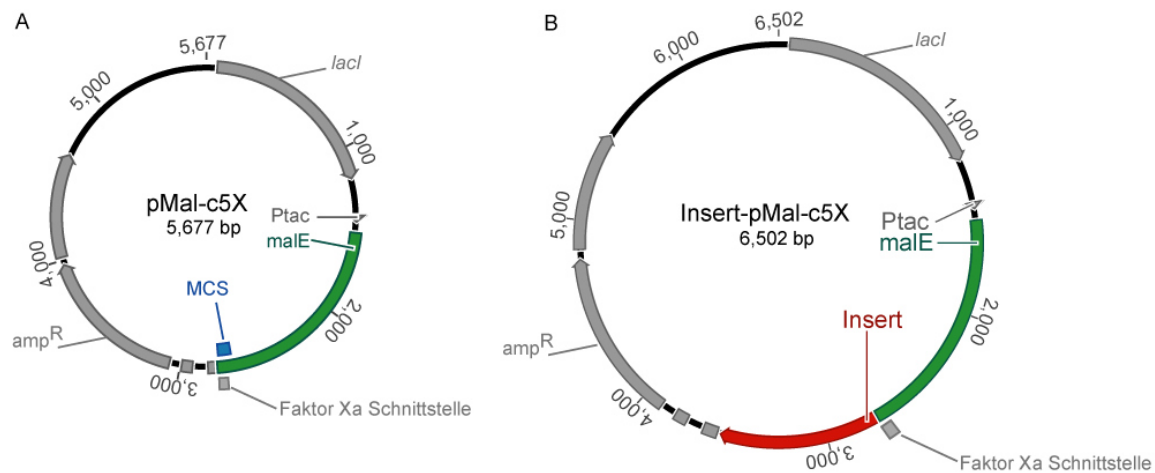


Abbildung 37: Expressionsvektor pMal-c5X (A) und pMal-c5X mit Insert (B).

Nach der Expression und Wachstum werden die Zellen geerntet, lysiert, durch Einfrieren und Auftauen und anschließend sonifiziert. Nach Zentrifugation wird der Überstand auf eine zuvor konditionierte Amyloseharz Säule gegeben (Abbildung 38). Das Fusionsprotein bindet dabei selektiv in folgenden Waschschritten am Amyloseharz, während Verunreinigungen durch andere Proteine in der Waschfraktion eluieren. Durch Zugabe von Maltose zum Waschpuffer wird das Fusionsprotein eluiert. Im letzten Schritt wird das Zielprotein durch Inkubation mit der Protease Faktor Xa vom MBP abgetrennt. Größenausschlusschromatographie liefert schlussendlich das gewünschte Zielprotein.

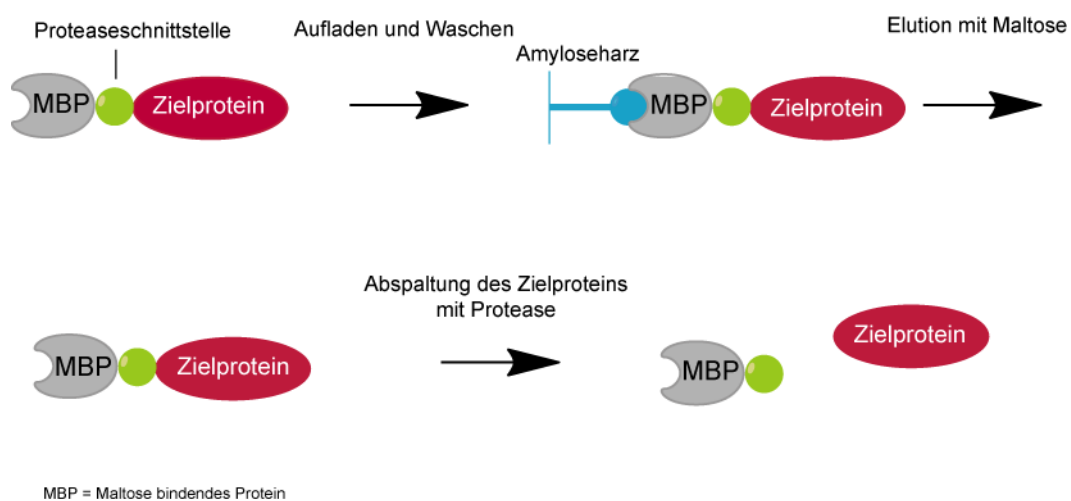


Abbildung 38: Aufreinigung des Fusionsprotein und Abspaltung des Zielproteins.

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR der Gene wurde mit Pfu Polymerase unter Zusatz von DMSO (w = 50 %) durchgeführt, da *B. japonicum* einen GC-reichen Organismus darstellt. Die Amplifikate der Monooxygenasen CYP112, CYP114 und CYP117 lieferten wie erwartet Fragmente mit den Größen 1205 Basenpaaren (bp), 1290 bp bzw. 1344 bp. Die Amplifizierung des Ferredoxins lieferte ein 291 bp großes Fragment (vgl. Abbildung 39). Die PCR der Ferredoxin Reduktase erbrachte auch nach mehrfacher Variation der Bedingungen wie Annealing Temperatur und DMSO Konzentration kein schlüssiges Amplifikat. Selbst erneute Extraktion der genomischen DNA von *B. japonicum* lieferte nicht das PCR-Produkt in gewünschter Größe.

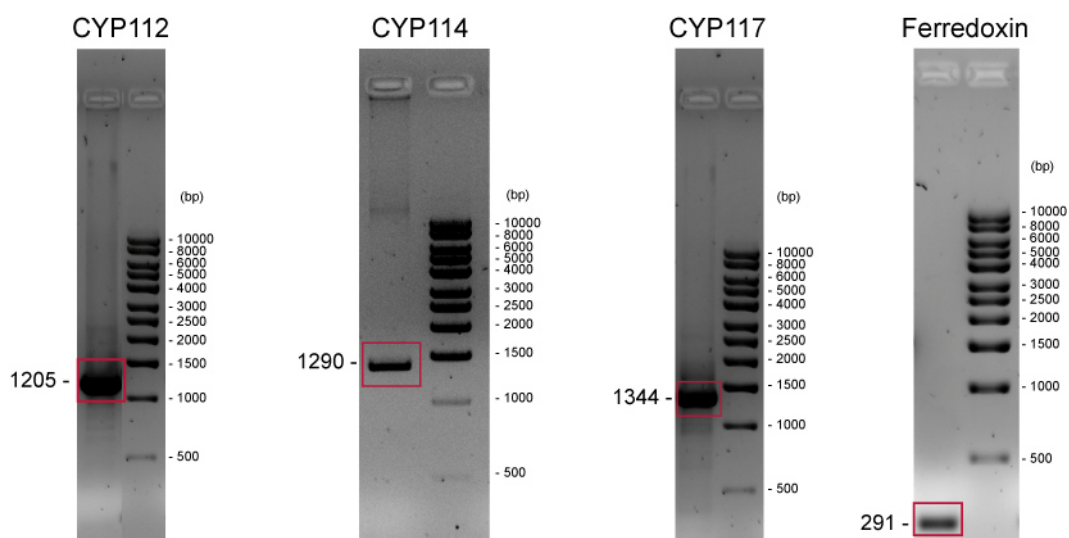


Abbildung 39: PCR-Produkte der amplifizierten Gene CYP112, CYP114, CYP 117 und Ferredoxin.

3.4 Restriktion, Ligation und Transformation in *E. coli* BL21 (DE3)

Nach dem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen und Aufreinigung der Inserts bzw. des linearisierten Vektors, wurden Vektor und Inserts ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* BL21 (DE3) elektrokompente Zellen mittels Elektroporation transformiert. Die Vervielfältigung und Selektion der Konstrukte erfolgte durch Ausplattierung auf LB Agar unter Zusatz von Ampicillin. Gewachsene Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf Tragen des Inserts überprüft. Plasmide positiver Kolonien

wurden nach Vervielfältigung in Flüssigmedium präpariert. Die entsprechenden Bedingungen sind den Abschnitten VIII.4.9 und VIII.4.10 zu entnehmen.

4. Heterologe Expression

4.1 Heterologe Expression des Ferredoxins

Die optimalen Bedingungen für die Expression des rekombinanten Fusionsproteins Fer-pMal-c5X stellten sich bei einer Expressionstemperatur von 28 °C für 4 Stunden ein. Dabei wurde vorerst für 30 min bei 28 °C äquilibriert bevor die Expression durch Zusatz von IPTG (Endkonzentration 0.3 mM) induziert wurde. Wie in Abbildung 40 links zu sehen wurde das für das Ferredoxin codierende Gen direkt hinter das *malE* Gen kloniert. Die Expression lieferte erwartungsgemäß ein Fusionsprotein mit einer Größe von 54 kDa (vgl. Abbildung 40 rechts) in der löslichen Fraktion.

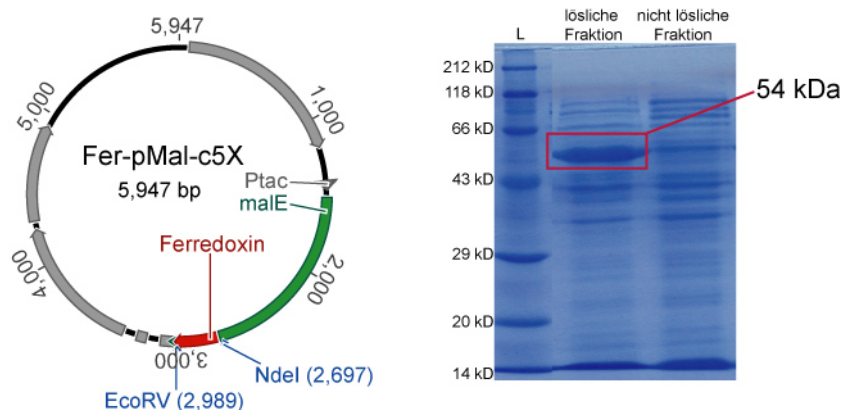


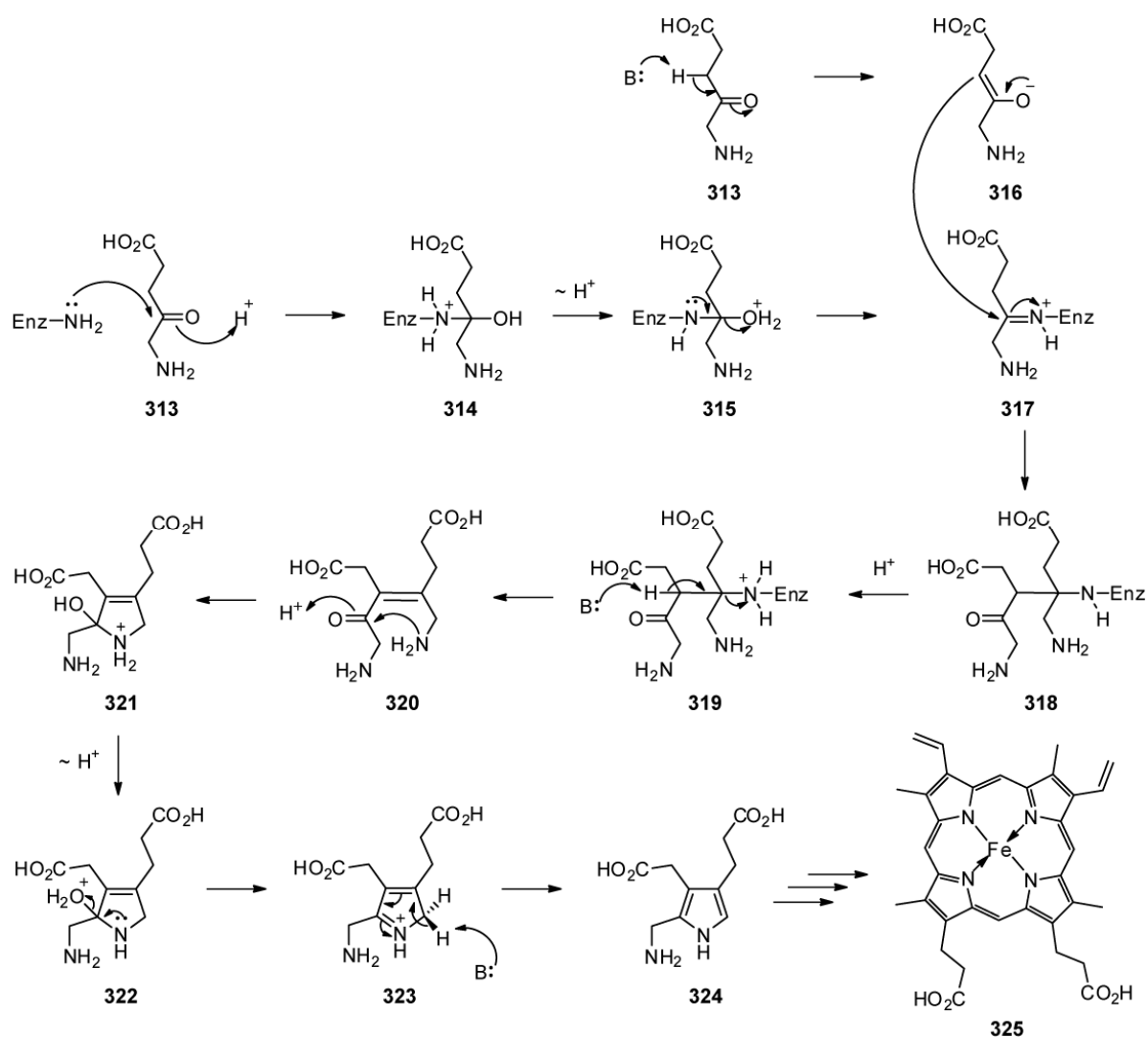
Abbildung 40: Vektor-Insert Konstrukt Fer-pMal-c5X (links), SDS-PAGE nach Expression und Extraktion (rechts), aufgetragen wurden L (Proteinleiter), lösliche Fraktion, nicht lösliche Fraktion. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

4.2 Heterologe Expression der P450-Monooxygenasen CYP 112, CYP114 und CYP117

Die alleinige Induktion mit IPTG (0.3 mM Endkonzentration) sowie unterschiedliche Inkubationstemperaturen (20 °C, 28 °C und 37 °C) führten nicht zur Expression der Fusionsproteine der drei Monooxygenasen. Literaturbekannt ist, dass ein Zusatz von

δ -Aminolävulinsäure (**313**) und Fe^{2+} zur Ausbildung des Porphyrinrings notwendig ist sowie die Stabilität einiger rekombinanter Cytochrom P450-Monooxygenasen gewährleistet und damit erst zur Expression führt.^[241–243] Dies erklärt sich durch die Biosynthese der prosthetischen Gruppe dem Protohäm (**325**), das aus einem Tetrapyrrolring aufgebaut ist und ein Fe^{2+} als Zentralatom trägt. Die Ausbildung einer Monomerpyrroleinheit startet mit zwei Einheiten **313** (Schema 34), welche unter Katalyse der δ -Aminolävulinsäuresynthase (ALAS) in einer Kondensation aus Glycin und Succinyl-Co-A gebildet wird. Bekannte Prokaryonten, die die ALAS besitzen sind Proteobakterien der Gruppe *Rhizobium*, *Rickettsia*, *Rhodobacter* und *Agrobacterium*.^[244] Nach der Bildung von **313** wird das erste Molekül δ -Aminolävulinsäure deprotoniert, wohingegen eine zweite Einheit **313** unter Katalyse der Porphobilinogen-Synthase eine Schiff'sche Base über die Zwischenstufen **314** und **315** ausbildet. Durch Kondensation von **316** und **317** werden beide Moleküle zu **318** miteinander verknüpft. Eine erneute Deprotonierung am α -Carbonylkohlenstoff sowie erneute Ausbildung einer Schiff'schen Base über die Zwischenstufen **319** und **320** führt zum Ringschluss in **321**. Eine Protonierung und folgende Dehydratisierung erzeugt Intermediat **323**. Dieses bildet im letzten Schritt durch Deprotonierung das aromatische System aus und liefert Porphobilinogen (**324**). Vier Einheiten **324** werden anschließend in weiteren Kondensationsreaktionen und Umlagerungen zu **325** verknüpft.^[244,245] Demnach kann angenommen werden, dass ein Zusatz von **313** sowie Fe^{2+} zusammen mit IPTG zur Ausbildung der prosthetischen Gruppe führt und somit zur Ausbildung der rekombinanten Fusionsproteine.

In Abbildung 41 ist die SDS-Page nach der Expression von CYP114-pMal-c5X mit und ohne Induktion von IPTG sowie Zusätzen von **313** (1.0 mM Endkonzentration) und Fe(II)chlorid (0.5 mM Endkonzentration) dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei einer Temperatur von 28°C. Bahn 2 zeigt die lösliche Fraktion mit Induktion durch IPTG und Zusätzen von **313** und Fe(II)chlorid. Die Bande liegt im erwarteten Bereich von 90 kDa (vgl. Abbildung 43), wodurch davon ausgegangen werden kann, dass das Fusionsprotein exprimiert wurde. Die nichtlösliche Fraktion mit Induktion und Zusätzen weist auch eine Bande im Bereich von 90 kDa auf, was möglicherweise mit der Aufarbeitungsweise sowie nicht optimalen Expressionsbedingungen und Inkubationsdauer zusammenhängen könnte. Die nichtlöslichen Fraktionen ohne Induktion und ohne Zusätze besitzen keine spezifische Bande im kalkulierten Bereich (Bahnen 1 und 4 Abbildung 41).



Schema 34: Biosynthese von Protohäm ausgehend von δ -Aminolävulinsäure.

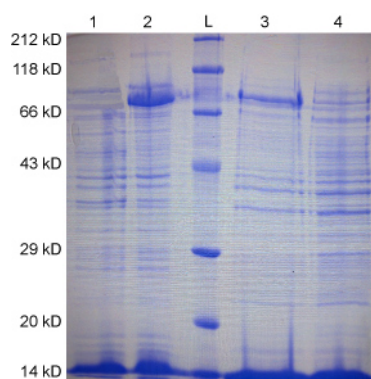


Abbildung 41: SDS-PAGE nach heterologer Expression von CYP114-pMal-c5X mit und ohne Induktion durch IPTG sowie mit (I) und ohne (O) Zusätze von **313** und Fe(II)chlorid. Lösliche Fraktion (O) (Bahn 1), lösliche Fraktion (I) (Bahn 2), L (Proteinleiter), nicht lösliche Fraktion (I), nicht lösliche Fraktion (O). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

Im Weiteren wurden die Expressionsbedingungen Inkubationstemperatur und Dauer getestet. Für das Fusionsprotein CYP112-pMal-c5X stellte sich eine Temperatur von 20 °C für 14 Stunden als günstig heraus. Wie in Abbildung 42 links zu sehen wurde in diesem Fall mit nur einer Restriktionsendonuclease gearbeitet, was eine zusätzliche Dephosphorylierung des Vektors vor der Ligation erforderlich machte, um Religationen zu vermeiden. Nach der Expression konnte schließlich ein 87 kDa großes Fusionsprotein in der löslichen Fraktion nach SDS-PAGE detektiert werden (vgl. Abbildung 42 rechts).

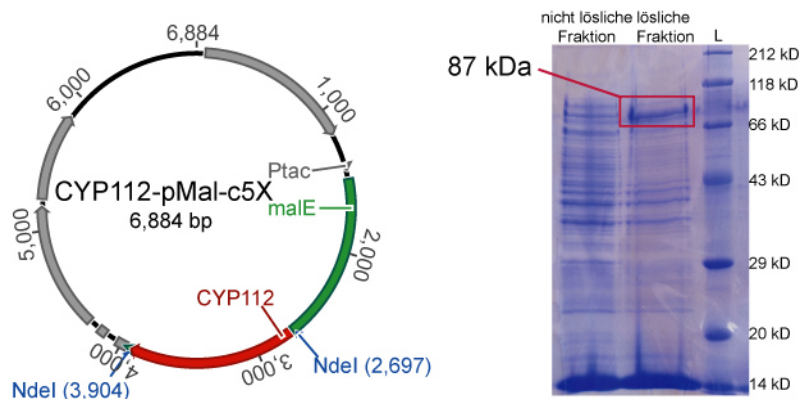


Abbildung 42: Vektor-Insert Konstrukt CYP112-pMal-c5X (links), SDS-PAGE nach Expression und Extraktion (rechts), aufgetragen wurden nicht lösliche Fraktion, lösliche Fraktion, L (Proteinleiter). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

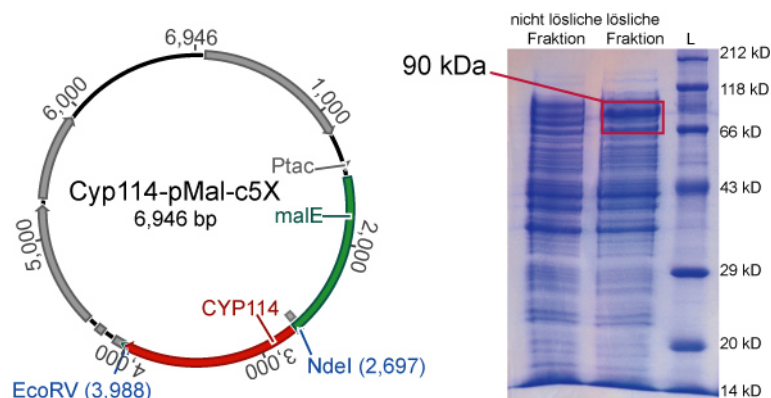


Abbildung 43: Vektor-Insert Konstrukt CYP114-pMal-c5X (links), SDS-PAGE nach Expression und Extraktion (rechts), aufgetragen wurden nicht lösliche Fraktion, lösliche Fraktion, L (Proteinleiter). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

Die Expression des Plasmids CYP117-pMal-c5X in *E. coli* BL21 (DE3) wurde bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C für 14 Stunden durchgeführt. Aus Abbildung 44 ist zu

erkennen, dass sowohl in der nichtlöslichen als auch in der löslichen Fraktion das Fusionsprotein enthalten ist. Es wurde lediglich eine geringe Menge CYP117-pMal-c5X erhalten. Jedoch konnten auch nach Expression unter anaeroben Bedingungen keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

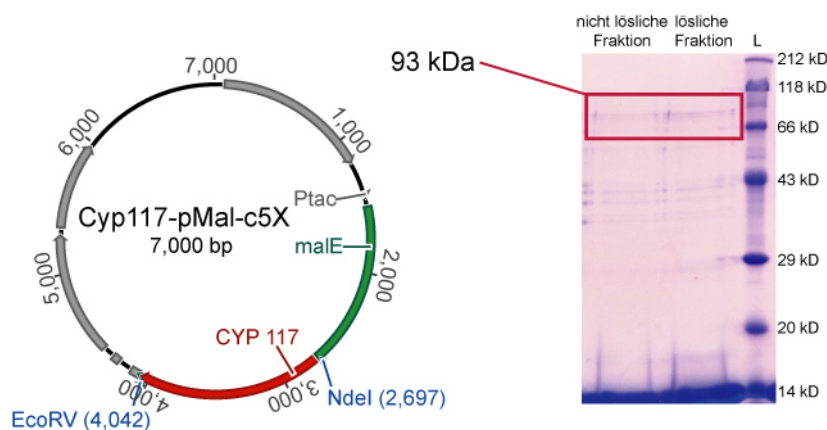


Abbildung 44: Vektor-Insert Konstrukt CYP117-pMal-c5X (links), SDS-PAGE nach Expression und Extraktion (rechts) aufgetragen wurden nicht lösliche Fraktion, lösliche Fraktion, L (Proteinleiter). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

4.3 Chromatographie der Fusionsproteine Fer-pMal-c5X und CYP114-pMal-c5X

Nach der Extraktion galt es nicht gewünschte Proteine von den Fusionsproteinen abzutrennen. Dafür wurde der lösliche Gesamtproteinextrakt auf eine zuvor konditionierte Amyloseharzsäule gegeben. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet (New England BioLabs[®] Inc.). Der Trennungsprozess erfolgt durch die Affinität des MBP zur Amylose, wobei eine Spezifität des MBP zur α -1,4-glycosidischen Bindung diskutiert wird.^[246] In mehreren Waschschritten sollte das Fusionsprotein am Amyloseharz binden. Die Elution des gewünschten Proteins wurde durch Zusatz von Maltose zum Waschpuffer erreicht, da das MBP eine noch höhere Affinität zur Maltose aufweist.

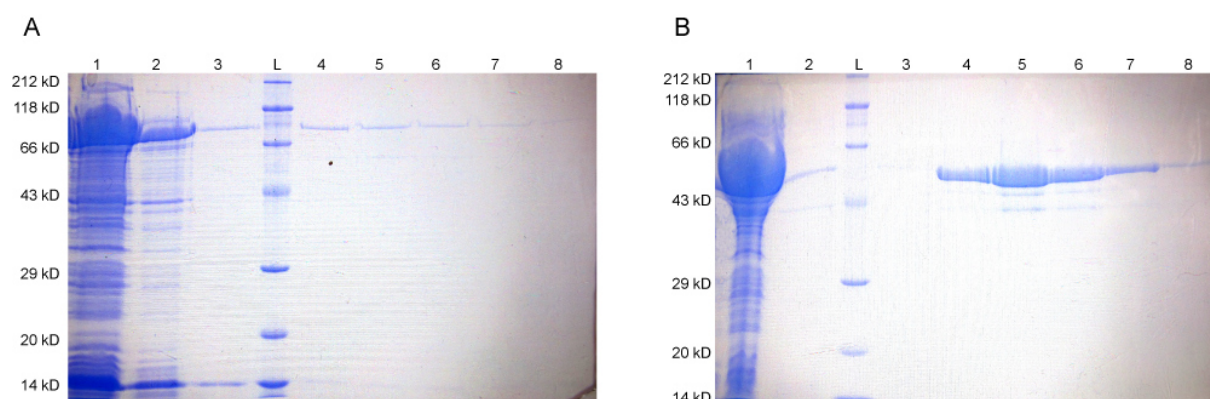


Abbildung 45: SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von A: CYP114-pMal-c5X. Gesamtproteinextrakt (Bande 1), Waschfraktion I (Bande 2), Waschfraktion II (Bande 3), Proteinleiter (L), Elutionsfraktionen (Bande 4-8); B: Fer-pMal-c5X. Gesamtproteinextrakt (Bande 1), Waschfraktion I (Bande 2), Proteinleiter (L), Waschfraktion II (Bande 3), Elutionsfraktionen (Banden 4-8). Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

In Abbildung 45A ist die SDS-PAGE der Amylosechromatographie des Fusionsproteins CYP114-pMal-c5X zu sehen. Auf Bahn 1 ist der Gesamtproteinextrakt aufgetragen worden, der eine breite Bande im Bereich zwischen 66 kD und 118 kD zeigt, was die Expression des gewünschten Fusionsprotein (90 kD) bestätigt. Die Bahnen 2 und 3 zeigen zwei ausgewählte Waschfraktionen, wobei auf beiden Bahnen das Fusionsprotein mit eluiert wurde. Dies bedeutet möglicherweise, dass die Konzentration des aufgetragenen Gesamtproteins zu groß gewesen ist, oder die Fließgeschwindigkeit zu hoch gewählt wurde, sodass die Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Fusionsprotein nicht stattfinden konnte. Auf den Bahnen 4-8 wurden die Elutionsfraktionen unter Zusatz von Maltose zum Fließmittel aufgetragen. In diesen Fraktionen ist erwartungsgemäß das Fusionsprotein CYP114-pMal-c5X enthalten. Die Fraktionen 4-8 wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert.

Der Verlauf der Affinitätschromatographie des Gesamtproteinextrakts Fer-pMal-c5X ist in Abbildung 45B dargestellt. Der eingesetzte Gesamtproteinextrakt ist wiederum auf Bahn 1 aufgetragen. Dieser zeigt eine breite Bande im Bereich zwischen 43 kD und 66 kD, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das 54 kD große Fusionsprotein exprimiert wurde. Die Waschfraktionen spiegeln die Bahnen 2 und 3 wider, wobei Bahn 2 abermals eine Bande im Größenbereich des Fusionsproteins aufweist. Die Elutionsfraktionen sind auf den Bahnen 4-8 aufgetragen. Hier zeigt sich, dass in den Fraktionen 5 und 6 sowohl das gewünschte Fusionsprotein als auch zwei weitere Proteine mit Größen zwischen 40 und 50 kD enthalten

sind. Die Fraktionen 4, 7 und 8 wurden vereinigt und für die Weiterverarbeitung aufkonzentriert.

4.4 Abspaltung des Maltose-binding-Protein

Die Spaltung des Fusionsproteins wurde mit Hilfe der Protease Faktor Xa durchgeführt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet und 1 % Protease der Gesamtproteinmenge zugesetzt. Es wurde in den Testansätzen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen gearbeitet und ferner wurde die Inkubationsdauer variiert. Abbildung 46 (Bahnen 1-4) zeigt die Abspaltung des MBP von CYP114-pMal-c5X. Zu erwarten waren Banden im Bereich von 42 kD für das MBP und 47 kD für CYP114. Auf Bahn 4 wurde das zur Spaltung eingesetzte Fusionsprotein aufgetragen, wobei dort bereits zwei Banden im Größenbereich des MBP und des Fusionsproteins (90 kD) zu sehen sind. Die Spaltung wurde bei RT für 2 Stunden (Bahn 2) und 4 Stunden (Bahn 1), sowie bei 4 °C für 48 Stunden (Bahn 3) durchgeführt.

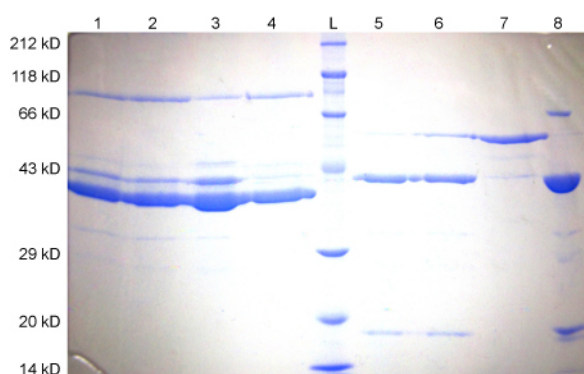


Abbildung 46: SDS-PAGE nach Abspaltung des MBP bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen: CYP114-pMal-c5X: RT, 4 Stunden (Bahn 1), RT, 2 Stunden (Bahn 2), 4 °C, 48 Stunden (Bahn 3), zur Spaltung eingesetztes Fusionsprotein (Bahn 4); Proteinleiter (L), Fer-pMal-c5X: RT, 4 Stunden (Bahn 5), RT, 2 Stunden (Bahn 6), zur Spaltung eingesetztes Fusionsprotein (Bahn 7), 4 °C, 48 Stunden (Bahn 8). Detektion der Proteine erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau.

Es konnte festgestellt werden, dass unter den gewählten Bedingungen nicht das gesamte Fusionsprotein gespalten wurde, was sich durch eine jeweilige Bande im Bereich um 90 kD widerspiegelt (vgl. Abbildung 46, Bahnen 1-3). Die Inkubation bei Raumtemperatur zeigte bei unterschiedlicher Dauer zwei Banden im Bereich um 43 kD, sowie eine schwache Bande > 43 kD, was möglicherweise CYP114 (47 kD) darstellen könnte. Eine Verdopplung der Inkubationszeit scheint bei Raumtemperatur keinen Effekt auszuüben, was aus der Intensität der Banden geschlussfolgert werden kann. Eine längere Inkubationszeit und niedrigere

Temperatur wirkt sich offensichtlich positiv auf die Spaltung des Fusionsproteins aus, da sich wie auf Bahn 3 zu sehen, die Intensität der Bande des Fusionsproteins schwächer geworden ist. Desweiteren taucht eine Bande im Bereich um 47 kD auf, die auf die gewünschte Monooxygenase CYP114 schließen lässt.

Die Spaltung des Fusionsprotein Fer-pMal-c5X wurde unter gleichen Bedingungen behandelt. Zu erwartende Banden sollten im Größenbereich von wiederum 43 kD für das MBP und 9 kD für das Ferredoxin liegen. Das eingesetzte Fusionsprotein (54 kD) ist auf Bahn 7 (Abbildung 46) aufgetragen. Die Bahnen 5 und 6 zeigen die Inkubationen bei Raumtemperatur für 4 bzw. 2 Stunden. Hier zeigt sich, dass eine Verdopplung der Inkubationszeit einen kompletten Abbau des Fusionsprotein erbringt, was sich in lediglich zwei Banden im Bereich um < 43 kD und < 20 kD widerspiegelt. Jedoch, konnte unter diesen Bedingungen nicht das Ferredoxin identifiziert werden. Die Inkubation bei 4 °C für 48 Stunden lässt sowohl das MBP erkennen, als auch eine Bande am unteren Ende der Lauffront, was möglicherweise das erwünschte Protein darstellt.

5. Heterologe Expression der P450-Monooxygenasen und Ferredoxin aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

Um den Biosyntheseweg von *B. japonicum* USDA 110 zu den Gibberellinen aufzuklären, sollten die dafür verantwortlichen Gene der vermutlich beteiligten Cytochrom P450-Monooxygenasen CYP112, CYP114, CYP117 sowie einer Ferredoxin Reduktase und des Ferredoxins coexprimiert werden. Es konnten für die drei Monooxygenasen Vektor-Insert-Konstrukte cloniert werden, die nach Induktion mit IPTG, δ -ALA und Fe^{2+} exprimiert wurden. Die Fusionsproteine Fer-pMal-c5X und CYP114-pMal-c5X wurden erfolgreich über Amyloseharz chromatographiert. Die Bearbeitung der Fusionsproteine mit der Proteinase Faktor Xa ergab, dass im Falle der Spaltung von CYP114-pMal-c5X eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 Stunden als Erfolg versprechend angesehen werden kann. Die Inkubationstemperatur sollte bei 4 °C bestehen bleiben. Die idealen Bedingungen der Spaltung von Fer-pMal-c5X konnten nicht abschließend geklärt werden, da die Anwesenheit des Ferredoxins unter den gewählten SDS-PAGE Bedingungen nicht sicher identifiziert wurde. Eine Spaltung bei 4 °C kann als sinnvoll angesehen werden, da hier ein Protein im

unteren Größenbereich (< 14 kD) detektiert wurde. Die Detektion des Ferredoxins könnte durch ein höher konzentriertes Acrylamidgel (20 %) möglicherweise vereinfacht werden.

VII. Ausblick

Der Nutzen von Sekundärmetaboliten aus Pflanzen und Mikroorganismen gegen Schmerzen, Krankheiten oder auch für religiöse Riten oder zur Parfümierung ist schon seit Jahrtausenden bekannt.^[247] Während sich die Verwendung der Mikroorganismen seiner Zeit größtenteils auf die fermentative Herstellung von Bier oder Sojasauce sowie die Käseproduktion beschränkte^[248], haben sich Mikroorganismen als Quelle für wirkungsvolle Sekundärmetabolite, wie die Entdeckung des Penicillins, bewährt. Seither wurden mikrobiell basierte Naturstoffe für die unterschiedlichsten Bereiche des alltäglichen Lebens zugänglich gemacht und dienen dabei als Schmerzmittel, Pestizide, Antibiotika oder auch Immunsuppressiva u.a. oder sind wirksam gegen Krebszellen wie Epothilon.^[5] Ferner zieht die Nahrungsmittel- und Aromaindustrie ihren Nutzen aus der Verwendung von Mikroorganismen als Produktlieferanten, so dass die steigende Nachfrage an Erzeugnissen, neben dem totalsynthetischen Weg auch durch Fermentation und Extraktion gedeckt wird.^[247]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden flüchtige und nichtflüchtige Sekundärmetabolite von Pilzen und Bakterien untersucht. Das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* stellte sich als potenter Lieferant für alkylsubstituierte Pyrazine heraus. Die Aufklärung des Biosyntheseweges zu den verschiedenen nachgewiesenen Pyrazinen gelang durch gezielte Ausschaltung der verantwortlichen Gene. Es stellte sich heraus, dass die Deletionsmutante der Ketolsäurereductoisomerase (Δ KR) einen Überfluss an verschieden alkylsubstituierten Pyrazinen sowie an Acyloinen bereitstellt.^[34] Biobasierte Chemikalien erfreuen sich immer größerer Nachfrage. Um eine industrielle Nutzbarkeit der Δ KR-Mutante als neuer Lieferant für biobasierte Acyloine und alkylsubstituierte Pyrazine abzuschätzen, könnte über Fermentationsversuche sowie Tests geeigneter Medien oder eventueller Zusätze die Maximalproduktion in weiteren Arbeiten ermittelt werden. Später könnten die Pyrazine Anwendung als Zusätze in nussigen oder röstigen Lebensmittelaromen dienen. Allerdings wird die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) und mögliche Auswirkungen wie das angebliche Auftreten von Allergien, Immunschwächen oder anderen Krankheiten infolge der Aufnahme von z. B. gentechnisch veränderten Lebensmitteln mittlerweile kontrovers diskutiert, wobei der Gesetzgeber eine technologisch bedingte Grenze von 0,9 % GMO im Endprodukt festgelegt hat ab derer erst die Kennzeichnungspflicht einzuhalten ist^[249].

Andererseits ist durch die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen wie beispielsweise *Bt*-Mais, der durch Einführung eines Gens aus *Bacillus thuringiensis* ein für

den Maiszünsler toxisches Protein produziert, der Ernteertrag gesteigert worden und der kostspielige Einsatz von synthetischen Pestiziden damit umgangen worden. Als Alternative für die Verwendung von Pestiziden sowie gentechnisch veränderten Organismen werden inzwischen Biopestizide erforscht, die durch die Produktion von mitunter flüchtigen Sekundärmetaboliten einen eigenen Antagonismus gegen bestimmte Pathogene ausführen können. Die Vorteile gegenüber den kommerziell verwendeten chemisch synthetischen Pestiziden sind vor allem eine hohe Selektivität gegenüber den Schadorganismen, keine Gefährdung der Nutzinsekten und keine Toxizität. Die Beurteilung der Selektivität eines Biopestizids gegenüber einem Schädling muss dabei speziell getestet werden. Verschiedene Stämme des Genus *Trichoderma* finden schon Anwendung als Biozide in der Agrarwirtschaft. Die in dieser Arbeit untersuchten Bodenpilze *Trichoderma viride* und *Trichoderma asperellum* lieferten nach Gasraumanalysen eine Reihe alkylsubstituierter Pyrone mit unterschiedlichen Kettenlängen.^[37] Das von *T. viride* vorwiegend produzierte 6-Pentyl-2H-pyran-2-on wurde bereits positiv auf antifungale Wirksamkeit getestet. Die weiteren identifizierten 6-Alkyl- und 6-Alkenyl- α -pyronisomere wurden bislang noch nicht auf Bioaktivitäten hin untersucht. Folgearbeiten könnten sich außerdem mit der Aufklärung der Interaktion des Pyrons mit dem Pathogen befassen. Ein möglicher Synergismus zwischen der Produktion der flüchtigen Pyrone und der Abgabe von chitinolytischen Enzymen wäre bei dem Antagonismus von *Trichoderma* denkbar.

Auch der Endophyt *Geniculosporium* sp. wird bereits aufgrund antagonistischer Eigenschaften als Biopestizid eingesetzt.^[196] Es wurden verschiedene Sekundärmetabolite des Endophyten auf unterschiedliche bioaktive Wirkungen hin getestet.^[197,200,201] Untersuchungen der flüchtigen Metabolite ausgehend von *Geniculosporium* sp. resultierten in der Identifizierung von 2-Butylbutenolid-2-enolid sowie der gesättigten Lactone *cis*- und *trans*-2-Butyl-3-methylbutanolid, die den größten Anteil der flüchtigen Produkte ausmachten.^[36] Um einen weiteren Zusammenhang zwischen den identifizierten Lactonen und antagonistischen Wirkungen abzuleiten, könnten Bioaktivitätstest mit den synthetischen Lactonen durchgeführt werden. Über Fütterungsexperimente mit isotope markierten Vorläufern könnte die Biosynthese der Lactone ermittelt werden, wobei diese wahrscheinlich aus dem Fettsäureabbau oder aus einer PKS-Sequenz resultiert. Ferner bestehen strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen dem aus *Streptomyces griseus* identifizierten Faktor A und den Lactonen aus *Geniculosporium* sp.. Möglicherweise besitzen diese Metabolite ebenfalls

Quorum sensing Eigenschaften und induzieren im Endophyt die Produktion eines weiteren Sekundärmetabolits.

Eine selektive Anwendung als Pestizid könnten auch die Metabolite von *Fusarium fujikuroi* bieten. In dieser Arbeit konnten Fusarinsäure, 3-Butylpyridin, Dehydrofusarinsäure sowie Homoallylpyridin als Produkte von *F. fujikuroi* ermittelt werden. Fusarinsäure ist als Welketoxin bekannt. Versuche mit Baumwolle zeigten, dass die Phytotoxizität vermutlich in Verbindung mit der Carboxylgruppe steht, da die ebenfalls verwendeten 3-Alkylpyridine keinerlei Wirkung im Assay zeigten.^[250] Des Weiteren zeigten Biotests von Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure herbizide Aktivität gegen das Unkraut *Striga hermonthica* (Hexenkraut), die von kommerziellen Interesse sein könnten.^[251] In mehreren Veröffentlichungen, die sich mit der Extraktion von Fusarinsäure und Analoga beschäftigten, konnten neben den erwähnten Säuren auch die korrespondierenden Methylester nachgewiesen werden, dessen herbizide Aktivität wesentlich höher war.^[104,130–132,250,251] In eigenen Extrakten von *F. fujikuroi* konnten die Methylester nicht identifiziert werden. Weitere Arbeiten könnten sich mit der Optimierung der Wachstumsbedingungen und Extraktion von *F. fujikuroi* beschäftigen. Auch Bioaktivitätstests von Fusarinsäure und Analoga mit ausgewählten Pflanzen könnten Aufschlüsse hinsichtlich der Verstoffwechslung geben, um einen selektiven Einsatz in der Agrarwirtschaft zu gewährleisten. Möglicherweise stellt sich *F. fujikuroi* als potenter Lieferant für das Herbizid heraus, wobei der Einsatz des Pilzes als Biozid wie *Trichoderma* oder *Geniculosporium* sp. durch die Produktion anderer mitunter phytotoxischer Sekundärmetabolite ausgeschlossen werden kann. Ein Beispiel für die toxische Wirkung konnte bereits vor langer Zeit durch die Weitergabe von *F. fujikuroi* produzierten Gibberellinen an Reispflanzen erbracht werden (Bakanae Krankheit).^[92]

Ein Anfang zur Aufklärung der bakteriellen Gibberellinsäuresynthese wurde durch die heterologe Expression der Monooxygenasen von *B. japonicum* erbracht. Durch die weitere Analyse der Abläufe der Oxidationsschritte können Unterschiede und Gemeinsamkeiten zur pflanzlichen sowie pilzlichen Gibberellinsynthese aufgezeigt werden, die möglicherweise Rückschlüsse auf die symbiotische Beziehung zwischen Pflanzen und Rhizobakterien oder dem Pathogenitätsfaktor der pilzlichen Gibberelline zulassen. Eine Besonderheit von Bakterien ist eine hohe Wachstumsrate und schnelle Produktion der Sekundärmetabolite im Gegensatz zum totalsynthetischen Ansatz. Da dieser kostspielig und zeitintensiv ist, sind nur wenige Gibberelline kommerziell verfügbar. Nach gezielter Genausaltung könnte durch

einfache Extraktion und Isolierung oder heterologer Expression der Proteine und anschließender Inkubation mit entsprechenden Substraten der Zugang zu neuen noch nicht erforschten Gibberellinen eröffnet werden.

VIII. Experimenteller Teil

1. Allgemeines

1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Chemikalien und Medienbestandteile wurden von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), sowie Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

1.2 Lösemittel

Die verwendeten Lösemittel wurden mittels Destillation gereinigt und nach Standardmethoden getrocknet.

1.3 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC): Die Reinheit einer Substanz während der Säulenchromatographie, sowie Reaktionsverläufe wurden mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Diese wurde auf 0.2 mm vorbeschichteten Plastikkarten Polygram Sil G/UV₂₅₄ (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Abhängigkeit der chemischen Eigenschaften der Substanzen durch Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm oder durch Derivatisierung mit Tauchreagenzien. Zur Anwendung kamen ethanolische Molybdatophosphorsäure- oder Vanillin – Lösung, sowie basische KMnO₄ – Lösung und ECKERT'S Reagenz. Dazu wurde die entwickelte DC-Karte mit dem entsprechenden Tauchbad gleichmäßig benetzt und nach Erhitzung erfolgte Auswertung des Chromatogramms.

Säulenchromatographie (LC): Säulenchromatographische Reinigungen erfolgten an Merck Kieselgel 60 (Korngrößen zwischen 40 und 63 μm) in den angegebenen Lösemittelgemischen.

Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC-MS): Die Durchführung von GC-MS Analysen erfolgte mit einem HP 6890 Series GC System mit einem HP 5973 massenselektiven Detektor (Hewlett-Packard Company, Wilmington, USA) oder einem Agilent 7890A Gaschromatograph verbunden mit einem Agilent 5975C massenselektiven Detektor. Retentionsindices wurde durch Injektion einer homologen Reihe der n-Alkane

(C8-C32) ermittelt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Vergleich der Massenspektren mit der Wiley 6 Library und der Essential Oil Library (Massfinder) sowie anhand synthetischer oder kommerziell erhältlicher Standards.

Tabelle 3:

GC-MS	HP6890 GC-HP5973 MS	Agilent 7890A GC- Agilent 5975
Säule	BPX-5 Kapillarsäule (25 m x 0.22	HP-5 MS Kapillarsäule (30 m x
Innendruck	77.1 kPa, He 23.3 mL min ⁻¹	77.1 kPa, He 23.3 mL min ⁻¹
Einspritzvolumen	1 µL, split (20:1, 60 s)	2 µL, splitless
Transfer-Line	300°C	300°C
Elektronen	70 eV	70 eV
GC Programm	Starttemperatur 50°C, für 5 min	Starttemperatur 50°C, für 5 min

1.4 Spektroskopische Methoden

¹H NMR: Protonenresonanzspektren wurden mit einem Bruker DPX-200 (200.1 MHz), einem Bruker AV II-300 (300.1 MHz), einem Bruker DPX-400 (400.1 MHz) oder einem Bruker AV II-600 (600.1 MHz) aufgenommen. Als interner Standard diente TMS und die Messtemperatur betrug 293.15 K. Es wurde in den jeweils angegeben deuterierten Lösemitteln gemessen. Multiplizitäten werden folgendermaßen bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), sext (Sextett) und m (Multipllett). Signalverbreiterungen werden zusätzlich zur Multiplizität mit einem br (breit) gekennzeichnet.

¹³C NMR: ¹³C-Resonanzspektren wurden mit einem Bruker DPX-200 (50.3 MHz), einem Bruker AV II-300 (75.5 MHz), einem Bruker DPX-400 (100.6 MHz) oder einem Bruker AV II-600 (150.9 MHz) aufgenommen. Als interner Standard diente TMS und die Messtemperatur betrug 293.15 K. Es wurde in den jeweils angegeben deuterierten Lösemitteln gemessen. Die Spinmultiplizität der ¹³C-Absorptionen wurde mittels DEPT-Spektren (Impulswinkel $\theta = 135^\circ$) bestimmt.

Infrarot (IR): Spektren wurden mit einem Bruker Tensor 27 mit der Diamant-ATR Methode aufgenommen. Die Positionen der Schwingungsbanden sind als Wellenzahl in cm⁻¹ angegeben. Die Intensitäten sind mit s (strong), m (medium) und w (weak) bezeichnet. Die Einteilung erfolgte anhand des transmittierten Lichts in %: s (< 50%), m (< 80%) und w (> 80%).

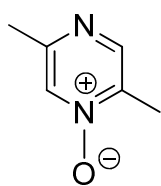
Ultraviolett-Visible (sichtbar) (UV/Vis): UV/Vis-Spektren wurden mit einem Cary 100 Bio der Firma Varian gemessen. Angegeben sind die Wellenlängen λ der Absorptionsmaxima in nm und die Extinktionskoeffizienten ϵ in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2. Synthesen

2.1 Darstellung der Pyrazin-N-oxide^[91]

Zu einer Suspension von $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (1.25 Äquiv.) in Eisessig wird das Pyrazin zugegeben (1 Äquiv. 0.25 mol L^{-1}). Es wird für 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösemittel unter reduziertem Druck abgetrennt. Der Rückstand wird mit 2 N NaOH verdünnt und die wässrige Lösung wird 3 Mal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie an Silicagel aufgereinigt, um die Pyrazin-*N*-Oxide zu erhalten. Im Falle der Umsetzung mit Trimethylpyrazin werden zwei nicht voneinander trennbare Regioisomere (Verhältnis der Produkte (**105a**:**105b**) 2:3) erhalten.

2,5-Dimethylpyrazin-*N*-oxid (**101**)

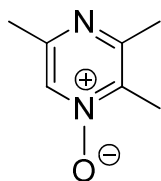


Ausbeute: 85 % (24.3 g, 196 mmol); **DC** (Diethylether/Methanol 10:1): $R_f = 0.22$; **GC (BPX5):** $I = 1305$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 2.35$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 130.7 \text{ Hz}$, 3 H CH_3), 2.41 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.6 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 7.98 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 187.4 \text{ Hz}$, 1 H, CH), 8.27 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 182.8 \text{ Hz}$, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.8$ (CH_3), 21.1 (CH_3), 132.1 (CH), 141.0 (C), 146.5 (CH), 154.7 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 124 (100) [M^+], 107 (53), 93 (2), 80 (71), 66 (21), 53 (11), 42 (20), 39 (47); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 10766 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 270 ($\epsilon = 10783 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3092$ (w), 3066 (w),

3020 (w), 2957 (w), 2925 (w), 1602 (m), 1514 (m), 1477 (s), 1460 (m), 1426 (w), 1385 (m), 1350 (s), 1309 (m), 1286 (m), 1220 (m), 1187 (m), 1146 (w), 1045 (s), 1011 (m), 948 (m), 875 (m), 788, 743 (m), 587 (m), 542 (m) cm^{-1} .

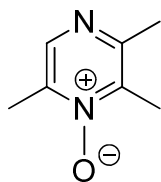
Trimethylpyrazin-*N*-oxide (105a und 105b). Ausbeute: 31 % (3.26 g, 23.6 mmol); **DC** (Diethylether/Methanol 10:1): $R_f = 0.31$; **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 11660 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 270 ($\epsilon = 11660 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2996$ (w), 2955 (w), 2923 (w), 2855 (w), 1442 (m), 1409 (m), 1379 (m), 1342 (m), 1268 (m), 1208 (w), 1178 (m), 1044 (m), 963 (s), 780 (w), 700 (w), 626 (w) cm^{-1} .

2,3,5-Trimethylpyrazin-*N*-oxid (105a)



GC (BPX5): $I = 1390$; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 2.43$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 130.5 \text{ Hz}$, 3 H CH_3), 2.46 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 130.3 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 2.56 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.4 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 7.94 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 187.6 \text{ Hz}$, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 12.4$ (CH_3), 21.1 (CH_3), 22.3 (CH_3), 130.2 (CH), 139.5 (C), 152.2 (C), 154.9 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 138 (100) [M^+], 121 (58), 107 (2), 94 (4), 80 (53), 66 (4), 53 (38), 42 (34), 39 (37).

2,3,6-Trimethylpyrazin-*N*-oxid (105b)

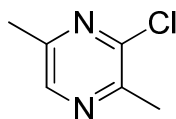


GC (BPX5): $I = 1361$; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 2.43$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.3$ Hz, 3 H CH_3), 2.50 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 130.3$ Hz, 3 H, CH_3), 2.56 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.2$ Hz, 3 H, CH_3), 8.21 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 182.7$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.0$ (CH_3), 14.6 (CH_3), 22.2 (CH_3), 140.9 (CH), 142.1 (C), 142.7 (C), 153.0 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 138 (100) [M^+], 121 (37), 107 (3), 94 (3), 80 (70), 66 (3), 53 (33), 42 (30), 39 (32).

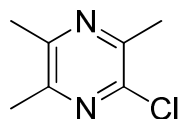
2.2 Darstellung der Chloropyrazine^[252]

Zu einer Lösung des entsprechenden Pyrazin-*N*-oxids wird in kleinen Portionen frisch destilliertes, eiskaltes POCl_3 bis zu einer Endkonzentration von 2 mol L^{-1} zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 6 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf Eis gegossen. Es wird eine Lösung von 6 N NaOH bis zu einem basischem pH vorsichtig zugetropft. Die wässrige Phase wird drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt. Die Chloropyrazine werden als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

2-Chloro-3,6-dimethylpyrazin (102)



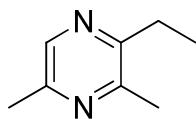
Ausbeute: 62 % (1.30 g, 9.15 mmol); DC (Pentan/ Diethylether 5:1): $R_f = 0.39$; **GC (BPX5):** $I = 1101$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 2.51$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.2$ Hz, 3 H CH_3), 2.62 (s, $^4J_{\text{C,H}} = 0.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 128.9$, 3 H, CH_3), 8.25 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 181.8$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 20.6$ (CH_3), 21.6 (CH_3), 141.5 (CH), 147.7 (C), 149.5 (C), 151.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 142 (100) [M^+], 107 (89), 80 (33), 73 (5), 52 (8), 42 (19), 39 (20); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 222$ ($\epsilon = 868 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 279 ($\epsilon = 6500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3045$ (w), 2998 (w), 2962 (w), 2926 (w), 1566 (w), 1449 (m), 1377 (w), 1328 (m), 1312 (s), 1247 (w), 1167 (w), 1083 (s), 1034 (w), 966 (m), 902 (m), 752 (w), 574 (w) cm^{-1} .

Chlorotrimethylpyrazin (106)

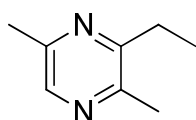
Ausbeute: 48 % (1.76 g, 11.3 mmol); DC (Pentan/Diethylether 5:1): $R_f = 0.37$; **GC (BPX5):** $I = 1191$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 2.48$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.9$ Hz, 3 H CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.57 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.7$ Hz, 3 H, CH_3) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 21.1$ (CH_3), 21.1 (CH_3), 21.5 (CH_3), 144.8 (C), 148.5 (C), 149.5 (C), 149.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 156 (100) [M^+], 121 (32), 115 (8), 80 (28), 74 (9), 64 (2), 53 (13), 42 (41), 39 (10); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 227$ ($\epsilon = 1374 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 281 ($\epsilon = 7377 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2996$ (w), 2955 (w), 2923 (w), 2855 (w), 1442 (m), 1409 (m), 1379 (m), 1342 (m), 1268 (m), 1178 (m), 1044 (m), 963 (s), 780 (m), 700 (w), 626 (m) cm^{-1} .

2.3 Allgemeine Darstellung der Kreuz-Kupplungsreaktion nach FÜRSTNER und LEITNER^[87]

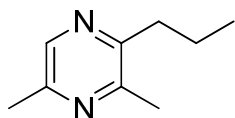
Entsprechend der Methode nach FÜRSTNER und LEITNER wird eine frisch zubereitete Lösung des Alkylmagnesiumbromids, hergestellt aus dem jeweiligen Alkylbromid (1.3 Äquiv.) und Magnesium (1.3 Äquiv.) in THF (1 mol L^{-1}), zu einer eiskalten Lösung aus Chloropyrazin oder Chloropyridin (1 Äquiv.), $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (5 mol %) in trockenem THF/NMP (10:1, 0.25 mol L^{-1}) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 15 min (**153a** und **153b** für 2 Stunden) bei 0°C gerührt und anschließend mit Wasser gequencht. Die wässrige Phase wird 3 Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung bringt die Alkylpyrazine als farblose Flüssigkeiten hervor. Im Falle der Chloropyridine **153a** und **153b** werden zwei säulenchromatographisch nicht trennbare Flüssigkeiten (Verhältnis der Regioisomere **153a:153b** 1:1.8) erhalten.

2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (30)

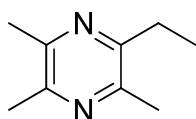
Ausbeute: 82 % (0.19 g, 1.4 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.28$; **GC (HP-5):** $I = 1082$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.28$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.54 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.3$ Hz, 3 H, CH_3), 2.81 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.0$ Hz, 2H, CH_2), 8.20 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 179.4$ Hz, 1H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 12.2$ (CH_3), 20.9 (CH_3), 21.4 (CH_3), 27.6 (CH_2), 140.8 (CH), 149.6 (C), 150.6 (C), 153.3 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 136 (79) [M^+], 135 (100), 121 (6), 108 (14), 107 (9), 94 (2), 80 (4), 67 (5), 56 (23), 42 (12), 39 (14); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 278$ ($\epsilon = 7429 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3461$ (w), 2972 (w), 2935 (w), 2876 (w), 1535 (w), 1463 (m), 1451 (m), 1388 (m), 1360 (w), 1328 (w), 1272 (w), 1171 (m), 1136 (w), 1050 (w), 1021 (w), 951 (w), 897 (w), 803 (w), 727 (w), 706 (w), 575 (w) cm^{-1} .

2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazin (31)

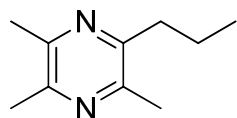
Ausbeute: 80 % (0.54 g, 3.97 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.22$; **GC (HP-5):** $I = 1077$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.23$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.6$ Hz, 3 H, CH_3), 2.45 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 0.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.8$ Hz, 3 H, CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.3$ Hz, 3 H, CH_3), 2.76 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.4$ Hz, 2 H, CH_2), 8.11 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 179.3$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 12.5$ (CH_3), 21.0 (2 x CH_3), 28.2 (CH_2), 140.6 (CH), 148.3 (C), 150.0 (C), 155.6 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 136 (99) [M^+], 135 (100), 121 (9), 108 (21), 107 (18), 94 (2), 80 (5), 67 (5), 56 (13), 42 (23), 39 (17); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 278$ ($\epsilon = 6831 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3042$ (w), 2972 (w), 2935 (w), 2877 (w), 1450 (m), 1366 (m), 1322 (w), 1275 (w), 1170 (w), 1137 (w), 1049 (w), 1030 (w), 1007 (w), 961 (w), 894 (w), 739 (w) cm^{-1} .

2-Propyl-3,5-dimethylpyrazin (91)

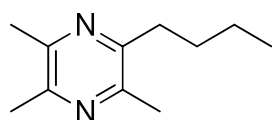
Ausbeute: 57 % (0.18 g, 1.2 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.35$; **GC (HP-5):** $I = 1169$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.01$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.74 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH_2), 2.48 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.54 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.3$ Hz, 3 H, CH_3), 2.76 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, 2 H, CH_2), 8.20 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 179.4$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.9$ (CH_3), 20.9 (CH_3), 21.5 (CH_3), 21.6 (CH_2), 36.4 (CH_2), 140.8 (CH), 149.6 (C), 150.7 (C), 152.3 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 150 (11) [M^+], 135 (21), 122 (100), 107 (4), 94 (1), 80 (4), 70 (3), 53 (5), 42 (6), 39 (8); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 222$ ($\epsilon = 868 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 279 ($\epsilon = 6500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3045$ (w), 2998 (w), 2962 (w), 2926 (w), 1566 (w), 1449 (m), 1377 (w), 1328 (m), 1312 (s), 1247 (w), 1167 (w), 1083 (s), 1034 (w), 966 (m), 902 (m), 752 (w), 574 (w) cm^{-1} .

Ethyltrimethylpyrazin (92)

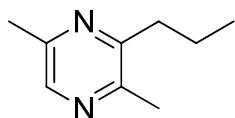
Ausbeute: 70 % (0.382 g, 2.54 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.34$; **GC (HP-5):** $I = 1162$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.25$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.4$ Hz, 3 H, CH_3), 2.46 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.47 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.76 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, CH_2) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 12.8$ (CH_3), 20.8 (CH_3), 21.29 (CH_3), 21.34 (CH_3), 27.7 (CH_2), 147.4 (C), 148.0 (C), 148.3 (C), 152.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 150 (72) [M^+], 149 (100), 135 (7), 122 (13), 121 (10), 107 (2), 94 (2), 80 (3), 67 (10), 56 (5), 53 (12), 42 (10); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 221$ ($\epsilon = 859 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 280 ($\epsilon = 8953 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2971$ (w), 2936 (w), 2875 (w), 1444 (m), 1411 (m), 1206 (m), 1177 (m), 1012 (w), 993 (w), 957 (w), 807 (w), 773 (w), 674 (w) cm^{-1} .

Propyltrimethylpyrazin (93)

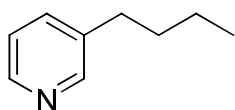
Ausbeute: 60 % (0.44 g, 2.7 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.39$; **GC (HP-5):** $I = 1243$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.00$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.2$ Hz, 3 H, CH_3), 1.69 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH_2), 2.46 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.47 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.0$ Hz, 3 H, CH_3), 2.71 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 2 H, CH_2) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 20.9 (CH_3), 21.32 (CH_3), 21.34 (CH_3), 22.1 (CH_2), 36.5 (CH_2), 147.6 (C), 148.0 (C), 148.3 (C), 151.7 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 164 (12) [M^+], 149 (18), 136 (100), 121 (4), 107 (1), 94 (3), 80 (2), 67 (2), 53 (10), 42 (5); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 226$ ($\epsilon = 842 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 281 ($\epsilon = 8134 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2956$ (m), 2927 (w), 2863 (w), 1446 (m), 1411 (m), 1199 (w), 1172 (w), 986 (w), 820 (w) cm^{-1} .

Butyltrimethylpyrazin (94)

Ausbeute: 80 % (0.52 g, 2.8 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 2:1): $R_f = 0.31$; **GC (HP-5):** $I = 1338$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.95$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.42 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2 H, CH_2), 1.60-1.67 (m, 2 H, CH_2), 2.46 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.0$ Hz, 3 H, CH_3), 2.47 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.0$ Hz, 3 H, CH_3), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.73 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, 2 H, CH_2) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.9$ (CH_3), 20.9 (CH_3), 21.31 (CH_3), 21.35 (CH_3), 22.7 (CH_2), 31.0 (CH_2), 34.4 (CH_2), 147.5 (C), 147.9 (C), 148.2 (C), 151.9 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 178 (1) [M^+], 163 (6), 149 (10), 136 (100), 121 (3), 94 (3), 80 (2), 67 (1), 53 (9), 42 (4); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 226$ ($\epsilon = 809 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 281 ($\epsilon = 8462 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3424$ (w), 2956 (m), 2927 (w), 2862 (w), 1445 (m), 1412 (m), 1199 (w), 1172 (w), 986 (w), 820 (w) cm^{-1} .

2-Propyl-3,6-dimethylpyrazin (103)

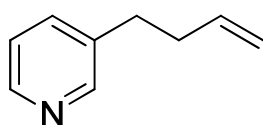
Ausbeute: 70 % (0.51 g, 3.4 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.3$; **GC (HP-5):** $I = 1164$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.01$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.2$ Hz, 3 H, CH_3), 1.72 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.49 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.3$ Hz, 3 H, CH_3), 2.53 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 127.2$ Hz, 3 H, CH_3), 2.75 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 2 H, CH_2), 8.15 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 179.2$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 21.0 (CH_3), 21.1 (CH_3), 21.9 (CH_2), 37.0 (CH_2), 140.6 (CH), 148.4 (C), 149.9 (C), 154.6 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 150 (13) [M^+], 135 (28), 122 (100), 107 (8), 96 (2), 80 (4), 67 (2), 53 (6), 42 (10), 39 (10); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 221$ ($\epsilon = 724 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 279 ($\epsilon = 7551 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3041$ (w), 2961 (m), 2930 (w), 2872 (w), 1448 (m), 1373 (m), 1287 (w), 1168 (w), 1145 (w), 1067 (w), 1032 (w), 997 (w), 943 (w), 892 (w), 734 (w) cm^{-1} .

3-Butylpyridin (145)

Ausbeute: 92 % (2.47 g, 18.4 mmol); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): $R_f = 0.2$; **GC (HP-5):** $I = 1144$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.93$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 118.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.36 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH_2), 1.56-1.64 (m, 2 H, CH_2), 2.60 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.0$ Hz, 2 H, CH_2), 7.19 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 7.48 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1 H, CH), 8.45 (m, 2 H, 2 x CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.8$ (CH_3), 22.1 (CH_2), 32.6 (CH_2), 33.2 (CH_2), 123.2 (CH), 135.6 (CH), 137.8 (C), 147.1

(CH), 149.9 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 135 (79) [M^+], 120 (3), 106 (16), 93 (94), 92 (100), 77 (7), 65 (22), 51 (7), 43 (7), 39 (14); **UV** (CH_2Cl_2): λ_{max} = 221 (ϵ = 967 L mol⁻¹ cm⁻¹), 258 (ϵ = 2226 L mol⁻¹ cm⁻¹), 263 (ϵ = 2322 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 3401 (w), 3028 (w), 2957 (m), 2860 (w), 1575 (w), 1478 (w), 1463 (w), 1422 (w), 1026 (w), 824 (w), 798 (w), 779 (w), 712 (s), 632 (w) cm⁻¹.

Homoallylpyridin (146)

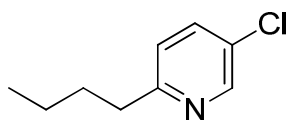


Ausbeute: 5 % (0.06 g, 0.45 mmol, als Mischung); **DC** (Pentan/ Diethylether 1:1): R_f = 0.17; **GC (HP-5)**: I = 1134; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 133 (24) [M^+], 118 (5), 105 (6), 92 (100), 77 (3), 65 (24), 51 (7), 43 (7), 39 (14).

Chlorobutylpyridine (153a und 153b)

Ausbeute: 68 % (1.15 g, 6.79 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 10:1): R_f = 0.39

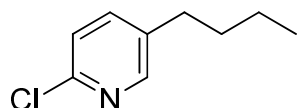
3-Chlor-5-butylpyridin (153a)



GC (BPX5): I = 1268; **¹H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ = 0.935 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 3 H, CH_3), 1.33-1.42 (m, 2 H, CH_2), 1.65-1.72 (m, 2 H, CH_2), 2.76 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.3 Hz, 2 H, CH_2), 7.08-7.09 (m, 1 H, CH), 7.55 (dd, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, $^4J_{H,H}$ = 2.6 Hz, 1 H, CH), 8.48 (d, $^4J_{H,H}$ = 2.5 Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ = 13.8 (CH_3), 22.3 (CH_2), 31.9 (CH_2), 37.4 (CH_2), 123.4 (CH), 129.1 (C), 135.9 (CH), 147.9 (CH), 160.7 (C) ppm; **EI-MS**

(70 eV) m/z (%) = 169 (< 1) [M^+], 168 (2), 156 (4), 154 (11), 142 (9), 140 (26), 129 (33), 128 (10), 127 (100), 126 (9), 112 (4), 104 (3), 92 (8), 78 (6), 65 (5), 51 (7), 41 (4), 39 (6).

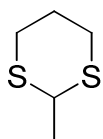
5-Chlor-3-butylpyridin (153b)



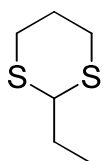
GC (BPX5): $I = 1374$; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.93$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3 H CH_3), 1.32-1.40 (m, 2 H, CH_2), 1.56-1.62 (m, 2 H, CH_2), 2.59 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 2 H, CH_2), 7.21-7.24 (m, 1 H, CH), 7.45 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1 H, CH), 8.20 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.7$ (CH_3), 22.1 (CH_2), 31.9 (CH_2), 33.1 (CH_2), 123.7 (CH), 136.8 (C), 138.7 (CH), 148.8 (C), 149.5 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV) m/z (%) = 169 (37) [M^+], 154 (2), 140 (4), 134 (4), 129 (15), 128 (36), 127 (47), 126 (100), 114 (2), 104 (5), 99 (8), 92 (5), 91 (13), 90 (10), 78 (5), 77 (8), 73 (7), 63 (6), 51 (13), 43 (16), 41 (17).

2.4 Darstellung der 1,3-Dithiane^[253]

Zu einer Lösung des jeweiligen Aldehyds in Dichlormethan (abs.) wird Propan-1,3-dithiol (1.1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C abgekühlt bevor $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.5 Äquiv.) zuge tropft wird. Es wird für eine Stunde bei 0°C gerührt. Nach Aufwärmen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung hydrolysiert. Es wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit NaOH (0.1 N) und gesättigter wässriger NaCl Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt.

2-Methyl-1,3-dithian (107)

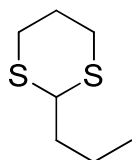
Ausbeute: 100 % (3.5 g, 27 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 10:1): $R_f = 0.26$; **GC (BPX5):** $I = 1172$; **$^1\text{H NMR}$** (200 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.48$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3 H, CH_3) 1.70-1.92 (m, 1 H, CH_2), 2.04-2.19 (m, 1 H, CH_2), 2.75-2.99 (m, 4 H, 2 x CH_2), 4.13 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (50 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 20.6$ (CH_3), 24.5 (CH_2), 30.0 (2 x CH_2), 41.3 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 134 (100) [M^+], 119 (59), 105 (4), 101 (4), 92 (5), 87 (12), 74 (42), 69 (9), 64 (5), 60 (24), 59 (26), 45 (25), 41 (17); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 640 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 251 ($\epsilon = 441 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2965$ (w), 2926 (w), 1895 (m), 2826 (w), 1444 (w), 1421 (m), 1371 (w), 1275 (w), 1237 (w), 1191 (m), 1119 (w), 1056 (w), 972 (w), 907 (m), 866 (w), 817 (w), 719 (m), 674 (m) cm^{-1} .

2-Ethyl-1,3-dithian (108)

Ausbeute: 96 % (2.3 g, 15.3 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.68$; **GC (BPX5):** $I = 1277$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.08$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 126.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.80 (quin, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2 H, CH_2), 1.80-1.92 (m, 1 H, CH_2), 2.08-2.17 (m, 1 H, CH_2), 2.80-2.92 (m, 4 H, 2 x CH_2), 3.99 (t, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 152.4$ Hz, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 11.4$ (CH_3), 26.0 (CH_2), 28.7 (CH_2), 30.3 (2 x CH_2), 49.2 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 148 (58) [M^+], 133 (1), 119 (100), 106 (2), 91 (2), 85 (4), 74 (20), 59 (5), 45 (15), 41 (16); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 882 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 249 ($\epsilon = 710 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2965$ (w), 2930 (w), 2897 (m), 2827 (w), 1454 (w),

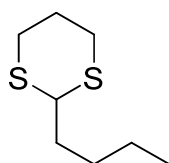
1421 (m), 1378 (w), 1274 (m), 1244 (w), 1185 (w), 1099 (w), 903 (w), 861 (w), 831 (w), 803 (m), 759 (w), 663 (w), 635 (w) cm^{-1} .

2-Propyl-1,3-dithian (109)



Ausbeute: 95 % (3.75 g, 23 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 10:1): $R_f = 0.5$; **GC (BPX5):** $I = 1357$; **$^1\text{H NMR}$** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.93$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.2$ Hz, 3 H, CH_3), 1.47-1.62 (m, 2 H, CH_2), 1.69-1.77 (m, 2 H, CH_2), 1.78-1.93 (m, 1 H, CH_2), 2.07-2.17 (m, 1 H, CH_2), 2.78-2.93 (m, 4 H, 2 x CH_2), 4.06 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.6$ (CH_3), 19.8 (CH_2), 26.0 (CH_2), 30.4 (2 x CH_2), 37.4 (CH_2), 47.3 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 162 (50) [M^+], 133 (4), 119 (100), 106 (3), 91 (4), 87 (6), 73 (10), 59 (5), 55 (10), 45 (12), 41 (8); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 889 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 249 ($\epsilon = 750 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2955$ (m), 2930 (m), 2898 (m), 2871 (w), 2827 (w), 1461 (w), 1421 (m), 1379 (w), 1275 (w), 1243 (w), 1184 (w), 1119 (w), 1097 (w), 909 (w), 767 (m), 682 (w), 664 (w), 641 (w) cm^{-1} .

2-Butyl-1,3-dithian (110)



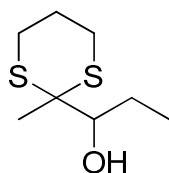
Ausbeute: 90 % (3.82 g, 22 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 10:1): $R_f = 0.46$; **GC (BPX5):** $I = 1492$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.91$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.34 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2 H, CH_2), 1.45-1.52 (m, 2 H, CH_2), 1.75 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 1.80-1.91 (m, 1 H, CH_2), 2.09-2.16 (m, 1 H, CH_2), 2.79-2.92 (m, 4 H, 2 x CH_2), 4.05 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 152.4$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS):

δ = 13.8 (CH₃), 22.2 (CH₂), 26.0 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.4 (2 x CH₂), 35.1 (CH₂), 47.5 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 176 (53) [M⁺], 133 (4), 119 (100), 106 (4), 101 (4), 87 (4), 73 (8), 60 (5), 45 (8), 41 (9); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 229 (ϵ = 803 L mol⁻¹ cm⁻¹), 249 (ϵ = 676 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 2954 (m), 2929 (m), 2898 (m), 2858 (w), 1461 (w), 1421 (w), 1378 (w), 1274 (w), 1241 (w), 1241 (w), 1182 (w), 1104 (w), 934 (w), 907 (w), 868 (w), 799 (w), 760 (w), 735 (w), 665 (w), 637 (w) cm⁻¹.

2.5 Darstellung der 2-Alkyl-2-(1-hydroxyalkyl)-1,3-dithiane^[254]

Zu einer Lösung von 1,3-Dithian in THF (0.5 mol L⁻¹) wird bei -78°C *n*-BuLi (1.6 mol L⁻¹ in Hexan, 1.1 Äquiv.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird innerhalb einer Stunde auf 0°C aufgewärmt, anschließend erneut auf -78°C abgekühlt und der entsprechende Aldehyd (1.3 Äquiv.) zugetropft. Nach Aufwärmen auf Raumtemperatur wird mit Wasser hydrolysiert. Die wässrige Phase wird drei Mal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zunächst mit Wasser, KOH-Lösung (7%) und wieder mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung an Flashgel liefert die 2-Alkyl-2-(1-hydroxyalkyl)-1,3-dithiane als blass gelbe Öle.

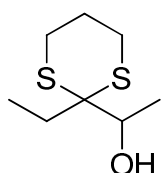
2-(1-Hydroxypropyl)-2-methyl-1,3-dithian (111)



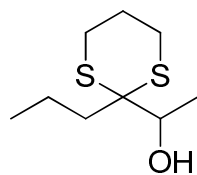
Ausbeute: 74 % (1.92 g, 10 mmol); DC (Hexan/ Ethylacetat 5:1): R_f = 0.32; **GC (BPX5):** I = 1570; **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 1.09 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.3 Hz, 3 H, CH₃), 1.26-1.48 (m, 1 H, CH₂), 1.39 (s, 3 H, CH₃), 1.71-2.17 (m, 3 H, 2 x CH₂), 2.62 (ddd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 14.6 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.5 Hz, 2 H, CH₂), 2.81 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 1.7 Hz, 1 H, OH), 3.01 (ddd, $^2J_{\text{H,H}}$ =

14.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 2 H, CH₂), 3.85 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.9$ Hz, 1 H, CH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 12.7$ (CH₃), 22.3 (CH₃), 23.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 26.1 (CH₂), 26.7 (CH₂), 54.5 (C), 73.7 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 192 (4) [M^+], 163 (1), 133 (100), 105 (2), 92 (2), 75 (3), 59 (18), 41 (4); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 772$ L mol⁻¹ cm⁻¹), 246 ($\epsilon = 980$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3473$ (br), 2962 (w), 2931 (w), 2909 (w), 2875 (w), 2829 (w), 1450 (w), 1421 (w), 1388 (m), 1372 (w), 1299 (m), 1276 (m), 1241 (w), 1109 (m), 1059 (m), 1027 (w), 972 (m), 907 (m), 869 (m), 781 (w), 731 (m), 673 (w), 648 (w) cm⁻¹

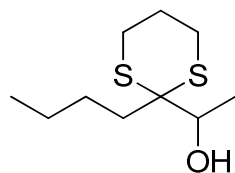
2-(1-Hydroxyethyl)-2-ethyl-1,3-dithian (112)



Ausbeute: 68 % (1.26 g, 6.6 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.2$; **GC (BPX5)**: $I = 1574$; ^1H NMR (200 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 1.09$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 3 H, CH₃), 1.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 3 H, CH₃) 1.50-2.14 (m, 4 H, 2 x CH₂), 2.65 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, 2 H, CH₂), 2.79 (br s, 1 H, OH), 2.98 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1 H, CH₂), 2.99 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, 1 H, CH₂), 4.24 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1 H, CH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 9.1$ (CH₃), 15.8 (CH₃), 24.4 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.8 (CH₂), 26.9 (CH₂), 59.7 (C), 68.0 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 192 (2) [M^+], 147 (100), 106 (3), 87 (2), 73 (19), 59(2), 45 (9), 41 (4); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 924$ L mol⁻¹ cm⁻¹), 243 ($\epsilon = 1016$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3467$ (b), 2972 (w), 2933 (w), 2911 (w), 2829 (w), 1451 (w), 1422 (w), 1384 (m), 1362 (w), 1273 (m), 1126 (w), 1082 (m), 1049 (m), 1032 (m), 944 (m), 902 (w), 858 (m), 808 (m), 729 (m), 617 (w) cm⁻¹.

2-(1-Hydroxyethyl)-2-propyl-1,3-dithian (113)

Ausbeute: 85 % (4.03 g, 19.6 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.32$; **GC (BPX5):** $I = 1655$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.36 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 127.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.54-1.65 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.77-1.89 (m, 2 H, CH_2), 2.02-3.03 (m, 1 H, CH_2), 2.63 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, 2 H, CH_2), 2.80 (br s, 1 H, OH), 2.99 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, 1 H, CH_2), 3.00 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.4$ Hz, 1 H, CH_2), 4.27 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.5$ (CH_3), 15.7 (CH_3), 17.9 (CH_2), 24.5 (CH_2), 25.0 (CH_2), 25.9 (CH_2), 36.2 (CH_2), 59.0 (C), 67.8 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 206 (1) [M^+], 161 (100), 119 (7), 107 (3), 101 (3), 87 (10), 75 (4), 59 (4), 45 (9), 43 (4), 41 (4); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 946$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$), 244 ($\epsilon = 1056$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3474$ (b), 2957 (m), 2933 (w), 2910 (w), 2872 (w), 2829 (w), 1457 (w), 1422 (w), 1386 (w), 1361 (w), 1274 (m), 1127 (w), 1096 (m), 1053 (m), 932 (w), 904 (m), 860 (w), 775 (m), 676 (w), 662 (w), 626 (w), 534 (w) cm $^{-1}$

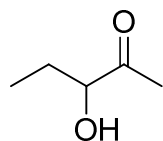
2-(1-Hydroxyethyl)-2-butyl-1,3-dithian (114)

Ausbeute: 71 % (7.62 g, 34.6 mmol); **DC** (Hexan/ Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.25$; **GC (BPX5):** $I = 1756$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH_2), 1.36 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 0.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 3 H, CH_3),

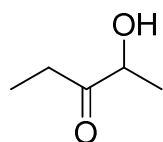
CH₃), 1.51-1.68 (m, 3 H, 2 x CH₂), 1.79-1.90 (m, 2 H, CH₂), 2.03-2.10 (m, 1 H, CH₂), 2.63 (ddd, ²J_{H,H} = 14.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 2 H, CH₂), 2.77 (br s, 1 H, OH), 2.99 (ddd, ²J_{H,H} = 14.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, ³J_{H,H} = 11.4 Hz, 1 H, CH₂), 3.00 (ddd, ²J_{H,H} = 14.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, ³J_{H,H} = 11.4 Hz, 1 H, CH₂), 4.28 (dq, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ¹J_{C,H} = 144.9 Hz, 1 H, CH) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 13.9 (CH₃), 15.7 (CH₃), 23.3 (CH₂), 24.5 (CH₂), 25.1 (CH₂), 26.0 (CH₂), 26.7 (CH₂), 33.8 (CH₂), 59.1 (C), 67.8 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): *m/z* (%) = 220 (1) [M⁺], 202 (1), 175 (100), 133 (2), 119 (6), 107 (4), 101 (4), 75 (4), 73 (5), 67 (3), 59 (4), 45 (6), 43 (6), 41 (6); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 228 (ε = 924 L mol⁻¹ cm⁻¹), 244 (ε = 1037 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: ν̃ = 3473 (b), 2953 (m), 2933 (m), 2869 (w), 1461 (w), 1422 (w), 1385 (w), 1361 (w), 1275 (m), 1128 (w), 1098 (w), 1053 (m), 942 (w), 908 (m), 870 (w), 804 (w), 733 (w) cm⁻¹

2.6 Darstellung der Acyloine

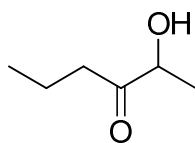
Zu einer Dispersion der 2-Alkyl-2-(1-hydroxyalkyl)-1,3-dithiane in Wasser (1 mol L⁻¹) wird AgNO₃ (5 Äquiv.) in H₂O (5 mol L⁻¹) zugegeben. Die Dispersion wird bei 70°C für 10 Stunden gerührt. Das Präzipitat wird abfiltriert und das Filtrat wird in ges. NaCl Lösung gegossen. Nach erneuter Filtration wird die wässrige Phase drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und vorsichtig eingeeengt. GC-MS Analyse des Rohprodukts zeigt die quantitative Umsetzung der 2-Alkyl-2-(1-hydroxyalkyl)-1,3-dithiane zu den entsprechenden Acyloinen. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel gereinigt. Das Entfernen der Lösemittel mittels Rotationsverdampfer führt zu einem signifikanten Verlust der aufgereinigten Produkte, aufgrund der hohen Flüchtigkeit.

3-Hydroxypentan-2-on (85)

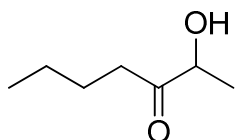
Ausbeute: 3 % (0.03 g, 0.29 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.24$; **GC (HP-5):** $I = 800$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.95$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3 H, CH_3) 1.64 (sept, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 1 H, CH_2) 1.92 (ddq, $^2J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 14.2$ Hz, 1 H, CH_2), 2.21 (s, 3 H, CH_3), 3.63 (br s, 1 H, OH), 4.18 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 111.7$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 8.1$ (CH_3), 24.5 (CH_3), 25.9 (CH_2), 77.0 (CH), 209.4 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 102 (2) [M^+], 73 (5), 59 (100), 43 (46), 41 (30); **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3473$ (b), 2972 (w), 2938 (w), 2880 (w), 1713 (w), 1360 (w), 1236 (w), 1124 (w), 1063 (w), 968 (w), 921 (w) cm^{-1} .

2-Hydroxypentan-3-on (86)

Ausbeute: 8 % (0.87 g, 0.8 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.29$; **GC (HP-5):** $I = 818$; **$^1\text{H NMR}$** (200 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.06$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.32 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 2.27-2.61 (m, 2 H, CH_2), 3.52 (br s, 1 H, OH), 4.19 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (50 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 6.9$ (CH_3), 19.2 (CH_3), 30.0 (CH_2), 71.7 (CH), 212.4 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 102 (2) [M^+], 87 (1), 57 (49), 45 (100), 43 (12), 41 (6), 39 (2); **IR:** $\tilde{\nu} = 3318$ (b), 2933 (w), 1730 (w), 1639 (w), 1608 (w), 1559 (w), 1457 (w), 1372 (w), 1281 (w), 1094 (w), 567 (w) cm^{-1} .

2-Hydroxyhexan-3-on (87)

Ausbeute: 29 % (0.653 g, 6 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.38$; **GC (HP-5):** $I = 900$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.94$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.38 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 1.67 (dsext, $^2J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.47 (m, 2 H, CH_2), 3.67 (br s, 1 H, OH), 4.25 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.6$ (CH_3), 17.0 (CH_2), 19.7 (CH_3), 39.3 (CH_2), 72.5 (CH), 212.5 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 116 (2) [M^+], 101 (1), 71 (70), 55 (17), 45 (100), 43 (88), 41 (19); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 174 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 244 ($\epsilon = 1037 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3437$ (b), 2966 (w), 2937 (w), 2877 (w), 1711 (m), 1558 (w), 1458 (w), 1404 (w), 1368 (w), 1260 (w), 1117 (m), 1029 (m), 541 (w) cm^{-1} .

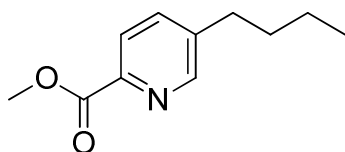
2-Hydroxyheptan-3-on (88)

Ausbeute: 8 % (0.356 g, 3 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.38$; **GC (HP-5):** $I = 999$; **$^1\text{H NMR}$** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3 H, CH_3), 1.34 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2), 1.39 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 1.57-1.67 (m, 2 H, CH_2), 2.37-2.58 (m, 2 H, CH_2), 3.64 (br s, 1 H, OH), 4.25 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.7$ (CH_3), 19.8 (CH_3), 22.3 (CH_2), 25.6 (CH_2), 37.2 (CH_2), 72.5 (CH), 212.7 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 130 (4) [M^+], 102 (1), 85 (85), 74 (10), 69 (81), 57 (100), 45 (95), 41 (62); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 230$ ($\epsilon = 313 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3439$ (b), 2960 (w), 2935 (w), 2873 (w), 1711 (m), 1460 (w), 1370 (w), 1261 (w), 1119 (m), 1044 (m), 913 (w), 888 (w), 536 (w) cm^{-1} .

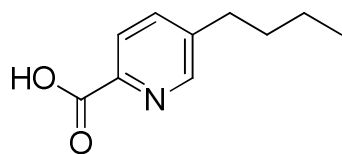
2.7 Pyridine und Fusarinsäure

Die Alkylierung der Pyridinisomere wird nach der Methode von FÜRSTNER und LEITNER durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.3).

Fusarinsäuremethylester (157)



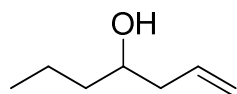
In ein Bombenrohr wird zu einer Lösung von **148a** und **148b** (3 mmol, 0.2 M) in Methanol Triethylamin (6.5 mmol, 2.2 Äquiv.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.09 mmol, 0.03 Äquiv.) gegeben. Das Bombenrohr wird verschlossen und ein Mal mit CO gespült. Anschließend wird mit 4 bar CO gefüllt und der Behälter für 17 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wird der Feststoff abgetrennt und mit MeOH gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung an Flashgel (1. Hexan : EtOAc 50:1 → EtOAc, 2. Pentan: Diethylether 1:1) liefert 44 mg (0.2 mmol, 20 %) des Esters als gelbliche Flüssigkeit. **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.21$; **GC (BPX5)**: $I = 1646$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.94$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.37 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH_2), 1.60-1.67 (m, 2 H, CH_2), 2.69 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, 2 H, CH_2), 4.00 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 147.5$ Hz, 3 H, CH_3), 7.64 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 1 H, CH), 8.05 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.05$ Hz, 1 H, CH), 8.56 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.21$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.7$ (CH_3), 22.1 (CH_2), 32.7 (CH_2), 32.9 (CH_2), 52.6 (CH_3), 124.8 (CH), 136.5 (CH), 142.1 (C), 145.5 (C), 150.0 (C), 165.8 (CH), 167.6 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 193 (< 1) [M^+], 163 (9), 150 (2), 135 (100), 122 (5), 106 (3), 91 (10), 77 (5), 65 (6), 51 (3); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 11277 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 268 ($\epsilon = 5092 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 2955$ (w), 2932 (w), 2862 (w), 1743 (m), 1721 (m), 1570 (w), 1436 (m), 1396 (w), 1309 (s), 1250 (m), 1193 (m), 1119 (s), 1026 (m), 969 (w), 860 (w), 791 (w), 780 (w), 709 (m), 632 (w) cm^{-1} .

Fusarinsäure (122)

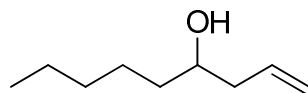
Zu einer Lösung von **157** (59 mg, 0.3 mmol) in THF (M), wird eine wässrige Lösung von LiOH · H₂O (21 mg, mol, M) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Es wird auf neutralen pH gebracht und mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird in Hexan umkristallisiert. Es werden 29 mg (0.16 mmol, 54 %) der Säure als weißer Feststoff erhalten. **GC (HP-5):** *I* = 1604; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 0.96 (t, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 3 H, CH₃), 1.38 (sext, ³*J*_{H,H} = 7.5 Hz, 3 H, CH₂), 1.62-1.68 (m, 2 H, CH₂), 2.75 (t, ³*J*_{H,H} = 7.7 Hz, 2 H, CH₂), 7.77 (d ³*J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1 H, CH), 8.18 (s, 1 H, CH), 8.56 (s, 1 H, CH), 9.45 (s, br, 1 H, OH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 13.7 (CH₃), 22.2 (CH₂), 32.8 (CH₂), 32.9 (CH₂), 123.8 (CH), 138.1 (2 x CH), 143.6 (C), 147.9 (C), 148.3 (C), 180.1 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): *m/z* (%) = 179 (< 1) [M⁺], 135 (100), 91 (16), 77 (6), 65 (9), 51 (4), 39 (6); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 232 (ε = 9135 L mol⁻¹ cm⁻¹), 269 (ε = 4543 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR):** ν̃ = 3084 (w, br), 2958 (m), 2929 (w), 2860 (w), 2222 (w), 1700 (m), 1586 (m), 1535 (w), 1466 (w), 1378 (m), 1343 (w), 1304 (m), 1276 (m), 1259 (m), 1213 (m), 1147 (w), 1138 (m), 1026 (m), 933 (w), 908 (m), 867 (w), 847 (w), 798 (m), 766 (m), 727 (s), 707 (m), 692 (m), 654, (m), 635 (m), 540 (m) cm⁻¹.

2.8 Darstellung der Homoallylalkohole^[255]

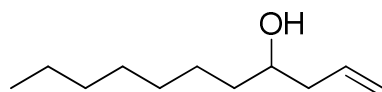
Zu einer Lösung von Pd(PPh₃)₄ (0.58 g, 0.5 mmol) in abs. THF (30 mL) wird Allylbenzoat (1.94 g, 12 mmol), der jeweilige Aldehyd (10 mmol) und Diethylzink (24 mmol, 1 M in Hexan, 24 mL) gegeben. Die entstehende blass gelbe Lösung wird für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit EtOAc verdünnt, mit 2 N HCl und wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung an Flashgel liefert die Homoallylalkohole als farblose Öle.

Hept-1-en-4-ol (228)

Ausbeute: 32 % (0.365 g, 3.2 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 4:1): $R_f = 0.43$; **GC (BPX5):** $I = 873$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.90\text{--}0.95$ (m, 3 H, CH_3), 1.39–1.52 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.69 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.29$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.56$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 0.64$ Hz, 1 H, CH_2), 1.87 (s br, 1 H, OH), 2.10–2.18 (m 1 H, CH), 2.27–2.34 (1 H, m), 3.63–3.69 (m, 1 H, CH_2), 5.11–5.13 (m, 1 H, CH_2), 5.14–5.16 (m, 1 H, CH_2), 5.78–5.88 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.1$ (CH_3), 18.8 (CH_2), 39.0 (CH_2), 41.9 (CH_2), 70.4 (CH), 118.0 (CH_2), 134.9 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 114 (1) [M^+], 96 (1), 73 (53), 69 (4), 55 (100); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 125 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3353$ (b), 3077 (w), 2959 (w), 2931 (w), 2873 (w), 1641 (w), 1463 (w), 1226 (w), 1122 (w), 1084 (w), 1066 (w), 1015 (w), 995 (s), 957 (w), 911 (s), 868 (w), 844 (w), 744 (w), 640 (w) cm^{-1} .

Non-1-en-4-ol (229)

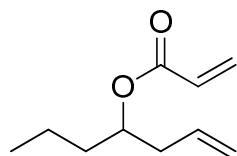
Ausbeute: 46 % (0.66 g, 4.6 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 4:1): $R_f = 0.53$; **GC (BPX5):** $I = 1070$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.89$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.80$ Hz, 3 H, CH_3), 1.26–1.35 (m, 3 H, 3 x CH_2), 1.45–1.49 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.58 (s br, 1 H, OH), 2.28–2.34 (m, 1 H, CH_2), 3.62–3.68 (m, 1 H, CH), 5.11–5.12 (m, 1 H, CH), 5.14–5.17 (m, 1 H, CH_2), 5.78–5.89 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 22.6 (CH_2), 25.3 (CH_2), 31.9 (CH_2), 37.3 (CH_2), 41.9 (CH_2), 70.7 (CH), 118.0 (CH_2), 134.9 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 101 (19) [M^+ -vinyl], 83 (56), 71 (7), 55 (87), 41 (100); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 230$ ($\epsilon = 213 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3351$ (w, br), 3077 (w), 2958 (w), 2930 (s), 2862 (w), 1714 (w), 1641 (w), 1463 (w), 1438 (w), 1379 (w), 1271 (w), 1124 (w), 1025 (w), 996 (w), 969 (w), 911 (s), 857 (w), 788 (w), 733 (w), 640 (w) cm^{-1} .

Undec-1-en-4-ol (230)

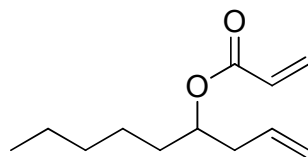
Ausbeute: 55 % (0.94 g, 5.5 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.53$; **GC (BPX5):** $I = 1278$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.79$ Hz, 3 H, CH_3), 1.24-1.34 (m, 9 H, 5 x CH_2), 1.43-1.50 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.64 (s br, 1 H, OH), 2.12-2.18 (m, 1 H, CH_2), 2.27-2.34 (m, 1 H, CH_2), 3.61-3.66 (m, 1 H, CH), 5.11-5.12 (m, 1 H, CH_2), 5.14-5.17 (m, 1 H, CH_2), 5.78-5.89 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.1$ (CH_3), 22.6 (CH_2), 25.7 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.6 (CH_2), 31.8 (CH_2), 36.8 (CH_2), 41.9 (CH_2), 70.7 (CH_2), 118.0 (CH_2), 134.9 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 170 (1) [M^+], 129 (17), 111 (19), 83 (6), 69 (100), 55 (39), 41 (54); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 230$ ($\epsilon = 122 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3349$ (w, br), 3077 (w), 2956 (w), 2925 (vs), 2855 (vs), 1641 (w), 1464 (w), 1126 (w), 1043 (w), 994 (w), 912 (vs), 722 (w), 641 (w) cm^{-1} .

2.9 Darstellung der Homoallylacrylate^[191]

Zu einer eiskalten Lösung von Homoallylalkohol (**228-230**, 2 mmol) in abs. CH_2Cl_2 und Triethylamin (1.6 g, 16 mmol) wird Acrylsäurechlorid (1.17 g, 13 mmol) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht auf Raumtemperatur aufgetaut. Der Überschuss an Acryloylchlorid wird mit ges. NaHCO_3 -Lösung eliminiert. Die wässrige Phase wird drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Flashgel liefert die Ester als farblose Flüssigkeiten.

Hept-1-en-4-yl-acrylat (231)

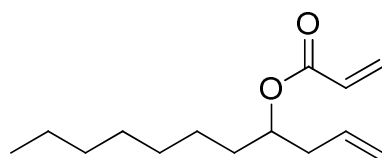
Ausbeute: 68 % (0.228 g, 1.36 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 20:1): $R_f = 0.37$; **GC (BPX5):** $I = 1088$; **$^1\text{H NMR}$** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.91$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.25-1.44 (m, 2 H, CH_2), 1.50-1.62 (m, 2 H, CH_2), 2.32-2.37 (m, 2 H, CH_2), 5.00-5.11 (m, 3 H, CH, CH_2), 5.70-5.83 (m, 2 H, 2 x CH), 6.11 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 17.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$ Hz, 1 H, CH_2), 6.39 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 17.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.59$ Hz, 1 H, CH_2) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.9$ (CH_3), 18.5 (CH_2), 35.7 (CH_2), 38.6 (CH_2), 73.3 (CH), 117.6 (CH_2), 128.9 (CH), 130.3 (CH_2), 133.7 (CH), 165.9 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 127 (22) [M^+ -allyl], 96 (4), 81 (5), 67 (4), 55 (100), 41 (19); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 242 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3080$ (w), 2961 (w), 2937 (w), 2875 (w), 1722 (vs), 1640, (w), 1405 (s), 1295 (s), 1270 (s), 1190 (vs), 1128 (w), 1046 (s), 985 (s), 964 (s), 915 (s), 809 (s), 674 (w) cm^{-1} .

Non-1-en-4-yl acrylat (232)

Ausbeute: 42 % (0.165 g, 0.84 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 10:1): $R_f = 0.59$; **GC (BPX5):** $I = 1262$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.69$ Hz, 3 H, CH_3), 1.23-1.38 (m, 6 H, 3 x CH_2), 1.53-1.64 (m, 2 H, CH_2), 2.31-2.37 (m, 2 H, CH_2), 5.00 (quint, $^3J_{\text{H,H}} = 6.13$ Hz, 1 H, CH), 5.03-5.08 (m, 1 H, CH_2), 5.09-5.10 (m, 1 H, CH_2), 5.71-5.79 (m, 1 H, CH), 5.80 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.60$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.33$ Hz, 1 H, CH_2), 6.11 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 10.33$ Hz, $^3J_{\text{H,H}}$

= 17.30 Hz, 1 H, CH), 6.39 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.56$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 17.30$ Hz, 1 H, CH₂) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 24.9 (CH₂), 31.6 (CH₂), 33.5 (CH₂), 38.6 (CH₂), 73.6 (CH), 117.6 (CH₂), 128.9 (CH), 130.3 (CH₂), 133.7 (CH), 165.9 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 155 (58) [M⁺-allyl], 124 (12), 96 (9), 83 (56), 73 (10), 67 (30), 55 (100), 41 (96); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 397$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3079$ (w), 2956 (w), 2931 (w), 2861 (w), 1722 (vs), 1640 (s), 1620 (w), 1464 (w), 1405 (s), 1295 (s), 1270 (s), 1190 (vs), 1128 (w), 1046 (s), 985 (s), 965 (s), 916 (s), 809 (s), 728(w), 650 (w), 552 (w) cm⁻¹.

Undec-1-en-4-yl acrylat (233)

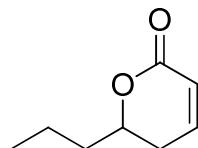


Ausbeute: 61 % (0.273 g, 1.22 mmol); DC (Hexan/Ethylacetat 10:1): $R_f = 0.59$; **GC (BPX5):** $I = 1458$; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 0.87 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.77$ Hz, 3 H, CH₃), 1.19-1.43 (m, 9 H, 5 x CH₂), 1.56-1.63 (m, 3 H, 2 x CH₂), 2.32-2.37 (m, 2 H, CH₂), 5.00 (quint, $^3J_{\text{H,H}} = 6.17$ Hz, 2 H, CH₂), 5.03-5.07 (m, 1 H, CH₂), 5.09-5.10 (m, 1 H, CH₂), 5.71-5.79 (m, 1 H, CH), 5.80 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.52$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.41$ Hz, 1 H, CH₂), 6.10 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 10.41$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 17.30$ Hz, 1 H, CH), 6.38 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.53$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 17.30$ Hz 1 H, CH₂) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 14.0 (CH₃), 22.6 (CH₂), 25.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.4 (CH₂), 31.8 (CH₂), 33.6 (CH₂), 38.6 (CH₂), 73.6 (CH), 117.6 (CH₂), 128.9 (CH), 130.3 (CH₂), 133.7 (CH), 165.9 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 183 [M⁺-allyl] (5), 152 (3), 111 (39), 96 (3), 81 (5), 67 (11), 55 (100), 41 (34); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 437$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 2927$ (s), 2857 (w), 1723 (s), 1640(s), 1463 (w), 1405 (s), 1295 (w), 1269 (s), 1191 (vs), 1046 (s), 984 (s), 964 (s), 915 (s), 808 (s) cm⁻¹.

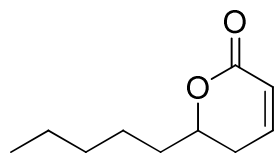
2.10 Darstellung der 5,6-Dihydro-2H-pyranone^[256]

Die Acrylate (**231-233**, 1 mmol) werden in abs. Toluol (20 mL) gelöst. Nach Zugabe des Grubbs` Katalysator der 2. Generation (10 mg, 0.01 mmol) wird für 1.5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt und liefert die α,β - ungesättigten δ -Lactone als farblose Öle mit fruchtigem, kokosartigem Geruch.

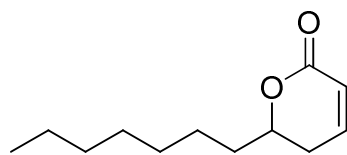
6-Propyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (234)



Ausbeute: 91 % (0.127 g, 0.91 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 3:1): $R_f = 0.2$; **GC (BPX5):** $I = 1302$; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 0.96$ (t, $^3J_{H,H} = 7.33$ Hz, $^1J_{C,H} = 125.2$ Hz 3 H, CH₃), 1.40-1.67 (m, 3 H, 2 x CH₂), 1.76-1.85 (m, 1 H, CH₂), 2.27-2.40 (m, 2 H, CH₂), 4.40-4.47 (m, 1 H, CH), 6.03 (ddd, $^3J_{H,H} = 1.32$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.40$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.76$ Hz, 1 H, CH), 6.87-6.91 (m, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 13.7$ (CH₃), 18.0 (CH₂), 29.3 (CH₂), 36.8 (CH₂), 77.7 (CH), 121.4 (CH), 145.0 (CH), 164.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 140 (1) [M⁺], (2), 112 (3), 97 (99), 68 (100), 55 (6), 41 (46); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{max} = 228$ ($\epsilon = 1514$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2960$ (w), 2935 (w), 2875 (w), 1714 (vs), 1466 (w), 1385 (s), 1243 (vs), 1159 (w), 1114 (s), 1069 (s), 1027 (s), 960 (w), 920 (w), 813 (vs), 744 (s), 662 (w), 575 (w), 553 (w) cm⁻¹.

6-Pentyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (177)

Ausbeute: 65 % (0.110 g, 0.65 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 3:1): $R_f = 0.3$; **GC (BPX5):** $I = 1516$; **$^1\text{H NMR}$** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.90$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.84$ Hz, 3 H, CH_3), 1.29-1.37 (m, 4 H, 2 x CH_2), 1.39-1.70 (, m, 3 H, 2 x CH_2), 1.74-1.86 (m, 1 H, CH_2), 2.31-2.36 (m, 2 H, 2 x CH_2), 4.38-4.47 (m, 1 H, CH), 6.01 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 1.38$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.31$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.69$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 184.9$ Hz, 1 H, CH), 6.86-6.92 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.9$ (CH_3), 22.4 (CH_2), 24.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 31.5 (CH_2), 34.8 (CH_2), 78.0 (CH), 121.3 (CH), 145.0 (CH), 164.6 (CH) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 168 (1) [M^+], 150 (1), 139 (2), 122 (3), 108 (7), 97 (100), 68 (78), 55 (9), 41 (50); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 1161 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 355 ($\epsilon = 16 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2931$ (s), 2868 (w), 1715 (vs), 1464 (w), 1385 (s), 1248 (vs), 1156 (w), 1118 (s), 1058 (s), 1037 (s), 954 (s), 813 (vs), 729 (w), 662 (w), 552 (w) cm^{-1} .

6-Heptyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (235)

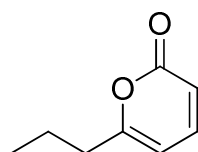
Ausbeute: 92 % (0.180 g, 0.92 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 3:1): $R_f = 0.35$; **GC (BPX5):** $I = 1729$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.65$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.28-1.36 (m, 7 H, 4 x CH_2), 1.38-1.55 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.60-1.71 (m, 1 H, CH_2), 1.74-1.84 (m, 1 H, CH_2), 2.31-2.37 (m, 2 H, CH_2), 4.39-4.46 (m, 1 H, CH), 6.01 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.40$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.65$ Hz, 1 H, CH), 6.87-6.91 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 22.5 (CH_2), 24.7 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.3 (CH_2), 31.7 (CH_2), 34.8 (CH_2), 78.0 (CH), 121.3 (CH), 145.0 (CH), 164.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV):

m/z (%) = 196 (1) [M^+], 168 (1), 150 (2), 136 (4), 125 (2), 111 (3), 97 (100), 86 (4), 81 (5), 68 (67), 55 (11); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{max} = 229$ ($\epsilon = 1203 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3358$ (w, br), 3077 (w), 2958 (w), 2930 (s), 1641 (w), 1464 (w), 1437 (w), 1124 (w), 1124 (w), 1025 (w), 995 (w), 911 (s), 731 (w), 639 (w) cm^{-1} .

2.11 Darstellung der 6-Alkyl-2H-pyrone

Zu einer Lösung der entsprechenden 5,6-Dihydro-2H-pyran-2-one **228-229** (1 mmol) in Chlorbenzol (5 mL) wird *N*-Bromsuccinimid (196 mg, 1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) und eine katalytische Menge AIBN (1 mg) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 8 Stunden auf 120 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird das Präzipitat abfiltriert und mit CH_3Cl gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. $NaSO_3$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung an Silicagel erbringt eine nicht trennbare Mischung bestehend aus den 6-Alkyl-2H-pyranonen und zwei diastereomeren 5-Bromo-6-alkyl-5,6-dihydro-2H-pyranonen. Diese Mischung wird in Triethylamin (5 mL) für 4 Tage unter Rückfluss erhitzt. Das Präzipitat wird abfiltriert und mit Benzol gewaschen. Das Filtrat wird unter reduziertem Druck eingeeengt. Säulenchromatographie an Flashgel liefert die gewünschten 6-Alkyl-2H-pyrone als leicht gelbliche Öle.

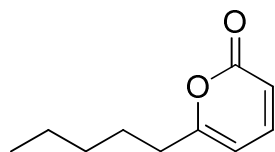
6-Propyl-2H-pyran-2-on (211)



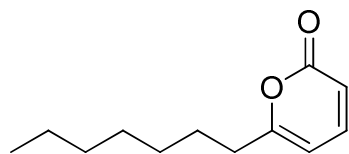
Ausbeute: 10 % (0.014 g, 0.10 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 10:1): $R_f = 0.21$; **GC (HP-5)**: $I = 1253$; **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$, TMS): $\delta = 0.97$ (t, $^3J_{H,H} = 7.6$ Hz, $^1J_{C,H} = 124.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.60 (sext, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.47 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 5.99 (dd, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 0.8$ Hz, 1 H, CH), 6.16 (dd, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, $^4J_{H,H} = 0.5$ Hz, 1 H, CH), 7.26 (dd, $^3J_{H,H} = 9.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 1 H, CH) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, TMS):

δ = 13.4 (CH₃), 20.2 (CH₂), 35.7 (CH₂), 102.8 (CH), 113.1 (CH), 143.7 (CH), 162.9 (CH), 166.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 138 (38) [M⁺], 110 (27), 95 (100), 81 (47), 39 (35); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 228 (ϵ = 1766 L mol⁻¹ cm⁻¹), 300 (ϵ = 2855 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR** (**ATR**): $\tilde{\nu}$ = 3402 (w), 3088 (w), 2965 (w), 2877 (w), 1699 (vs), 1629 (s), 1554 (s), 1465 (w), 1381 (w), 1208 (w), 1173 (w), 1108 (w), 1085 (w), 990 (w), 908 (w), 801 (s), 731, 554 (s) cm⁻¹.

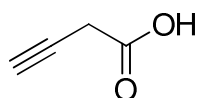
6-Pentyl-2H-pyran-2-on (179)



Ausbeute: 21 % (0.035 g, 0.21 mmol); DC (Hexan/Ethylacetat 5:1): R_f = 0.22; **GC (HP-5):** I = 1468; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 0.88 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.24-1.36 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.63-1.72 (m, 2 H, CH₂), 2.48 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, $^1J_{\text{C,H}}$ = 128.8 Hz, 2 H, CH₂), 5.97 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.6 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.8 Hz, 1 H, CH), 6.15 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.3 Hz, $^4J_{\text{H,H}}$ = 0.6 Hz, 1 H, CH), 7.26 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.5 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 9.4 Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 26.9 (CH₂), 31.5 (CH₂), 33.8 (CH₂), 102.5 (CH), 143.7 (CH), 162.9 (C), 166.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 166 (34) [M⁺], 138 (8), 123, (6), 110 (39), 95 (100), 81 (36), 67 (17), 53 (7), 39 (29); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 229 (ϵ = 1544 L mol⁻¹ cm⁻¹), 299 (ϵ = 1620 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm **IR** (**ATR**): $\tilde{\nu}$ = 2957 (s), 2931 (s), 2871 (w), 1704 (vs), 1629 (s), 1554 (w), 1467 (w), 1406 (w), 1379 (w), 1209 (w), 1173 (w), 1092 (w), 984 (w), 937 (w), 804 (w), 729 (w), 560 (w) cm⁻¹.

6-Heptyl-2H-pyran-2-on (212)

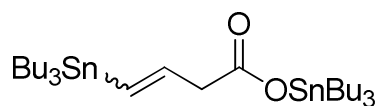
Ausbeute: 27 % (0.52 g, 0.27 mmol); DC (Pentan/Diethylether 5:1): $R_f = 0.2$; **GC (HP-5):** $I = 1677$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.20-1.38 (m, 8 H, 4 x CH_2), 1.62-1.70 (m, 2 H, CH_2), 2.48 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz 2 H, CH_2), 5.97 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 0.8$ Hz, 1 H, CH), 6.15 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.33$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 0.8$ Hz, 1 H, CH), 7.26 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 22.5 (CH_2), 26.8 (CH_2), 28.87 (CH_2), 28.89 (CH_2), 31.6 (CH_2), 33.8 (CH_2), 102.6 (CH), 113.0 (CH), 143.7 (CH), 162.9 (CH), 166.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 194 (16) [M^+], 165 (5), 149 (5), 137 (5), 123 (21), 110 (32), 95 (100), 82 (50), 68 (18), 53 (19), 41 (41); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 2364 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 300 ($\epsilon = 5170 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2955$ (w), 2926 (s), 2856 (s), 1727 (vs), 1634 (s), 1557 (s), 1463 (s), 1378 (w), 1356 (w), 1256 (w), 1211 (w), 1211 (w), 1084 (s), 979 (w), 857 (w), 797 (s), 549 (w) cm^{-1} .

2.12 Darstellung von Butinsäure (238)^[257]

Zu einer Lösung von CrO_3 (5.7 mol L^{-1}) in H_2O wird bei 0°C konz. H_2SO_4 (0.6 mol L^{-1}) getropft. Ein sich eventuell bildender Niederschlag wird durch tropfenweise Zugabe von H_2O wieder in Lösung gebracht. Die Lösung wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0°C wird eine Lösung von 3-Butin-1-ol (**237**) in Aceton (1.98 mol L^{-1}) innerhalb von 1.5 Stunden zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für weitere 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Isopropanol wird der Überschuss an

CrO₃ gequenchet. Die Lösemittel werden im Vakuum abgetrennt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wird mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird im Vakuum an einer Vigreux-Kolonne fraktioniert, um nicht umgesetztes Startmaterial abzutrennen. Umkristallisation des Rückstandes liefert Butinsäure als weiße Plättchen. **Ausbeute:** 14 % (2.48 g, 29.5 mmol); **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 2.24 (t, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, ¹J_{C,H} = 252.8 Hz, 1 H, CH), 3.38 (d, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, ¹J_{C,H} = 132.8 Hz, 2 H, CH₂) 9.77 (s br, 1 H, OH) ppm; **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 25.6 (CH₂), 72.4 (CH), 74.7 (C), 174.1 (C) ppm; **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 228 (ϵ = 59 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu}$ = 3295 (s), 3280 (s), 3022 (s), 2943 (s), 2911 (s), 2746 (s), 2634 (s), 2538 (s), 2223 (w), 2127 (w), 1730 (vs), 1689 (vs), 1423 (s), 1391 (s), 1321 (s), 1289 (s), 1229 (vs), 1208 (vs), 938 (s), 871 (vs), 686 (vs), 656 (vs), 633 (vs) cm⁻¹.

2.13 Darstellung von Tributylstannyl 4-(tributylstannyl)but-3-enoat (197)^[173]



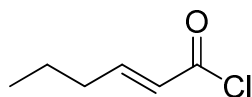
Zu einer Lösung von (238) in Toluol (0.6 mol L⁻¹) wird Tributylzinnhydrid und Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) (0.2 mmol L⁻¹) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für drei Stunden auf 100°C erhitzt. Das Lösemittel wird unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in 15 mL CCl₄ gelöst. Es wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wässrige KF-Lösung (1 M, 30 mL) und Aceton (30 mL) zugegeben. Das Präzipitat wird abgetrennt. Das Filtrat wird mit Diethylether extrahiert. Es wird über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. **Ausbeute:** 19.6 g, 29 mmol; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0.79-0.97 (m, 24 H, 3 x CH₂, 6 x CH₃), 1.17-1.39 (m, 18 H, 9 x CH₂), 1.43-1.69 (m, 12 H, 6 x CH₂), 3.17 (d, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 2 H, CH₂), 6.04-6.14 (m, 2 H, 2 x CH) ppm; **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 7.67 (CH₂), 7.74 (CH₂), 9.4 (CH₂), 10.1 (CH₂), 10.2 (CH₂), 13.58 (3 x CH₃), 13.64 (3 x CH₃), 16.4 (CH₂), 27.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.3 (CH₂), 27.4 (CH₂), 27.5 (CH₂), 27.6 (CH₂), 27.7

(CH₂), 27.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 44.0 (CH₂), 128.2 (CH), 129.0 (CH), 176.9 (C) ppm; **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\max} = 230$ ($\epsilon = 2296$ L mol⁻¹ cm⁻¹), 273 ($\epsilon = 994$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 2955$ (s), 2922 (s), 2871 (w), 2853 (w), 1557 (s), 1461 (w), 1378 (s), 1149 (w), 1075 (w), 991 (w), 961 (w), 870 (w), 770 (w), 736 (w), 668 (s), 597 (s) cm⁻¹

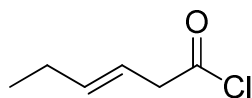
2.14 Darstellung der Säurechloride

Die Alkensäuren (9 mol L⁻¹) werden mit Thionylchlorid versetzt und unter Rückfluss erhitzt bis keine Gasentwicklung mehr zu erkennen ist. Anschließend werden die Säurechloride mittels Vakuumdestillation an einer Vigreuxkolonne abdestilliert.

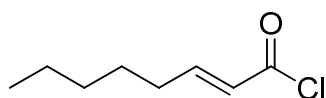
(E)-Hex-2-enoylchlorid (240)



Ausbeute: 74 % (2.16 g, 16 mmol); **GC (BPX5):** $I = 1115$; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 0.97$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3 H, CH₃), 1.55 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2 H, CH₂), 2.28 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 2 H, CH₂), 6.08 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 15.1$ Hz, 1 H, CH), 7.22 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 15.3$ Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 13.6$ (CH₃), 21.0 (CH₂), 34.4 (CH), 126.4 (CH), 157.1 (CH), 165.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 97 (100) [M⁺-Cl], 89 (2), 81 (4), 75 (3), 68 (13), 63 (3), 55 (57), 44 (4), 40 (27).

(E)-Hex-3-enoyl chlorid (241)

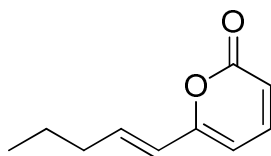
Ausbeute: 43 % (1.24 g, 9.3 mmol); **GC (BPX5):** $I = 1050$; **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.01$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.04-2.12 (m, 2 H, CH_2), 3.55 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2 H, CH_2), 5.45-5.53 (m, 1 H, CH), 5.68-5.74 (m, 1 H, CH) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.1$ (CH_3), 25.5 (CH_2), 50.1 (CH_2), 118.2 (CH), 139.1 (CH), 172.4 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 132 (1) [M^+], 104 (4), 97 (11), 90 (4), 81 (4), 75 (6), 69 (100), 63 (9), 53 (21), 41 (67); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 11831 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 273 ($\epsilon = 457 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3040$ (w), 2967 (w), 2936 (w), 2877 (w), 1797 (s), 1710 (s), 1460 (w), 1401 (w), 1289 (w), 1221 (w), 1119 (w), 965 (s), 815 (w), 756 (w), 704 (s), 591 (s) cm^{-1} .

(E)-Oct-3-enoylchlorid (242)

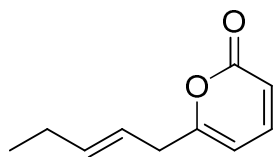
Ausbeute: 74 % (2.6 g, 16.3 mmol); **GC (BPX5):** $I = 1137$; **^1H NMR** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.91$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3 H, CH_3), 1.26-1.37 (m, 4 H, 2 x CH_2), 1.45-1.58 (m, 2 H, CH_2), 2.23 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2 H, CH_2), 6.07 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 15.2$ Hz, 1 H, CH), 7.21 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 15.2$ Hz, 1 H, CH) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.8$ (CH_3), 22.2 (CH_2), 27.3 (CH), 31.3 (CH_2), 32.4 (CH_2), 126.2 (CH), 157.3 (CH), 165.8 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 160 (1) [M^+], 125 (100), 81 (10), 68 (30), 55 (73), 39 (39); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 11831 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 273 ($\epsilon = 994 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 280 ($\epsilon = 826 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2945$ (w), 2882 (w), 1718 (s), 1601 (w), 1451 (w), 1361 (w), 1314 (w), 1266 (s), 1176 (w), 1109 (w), 1069 (w), 1025 (w), 971 (w), 933 (w), 709 (s), 687 (w) cm^{-1} .

2.15 STILLE-Kupplung^[173]

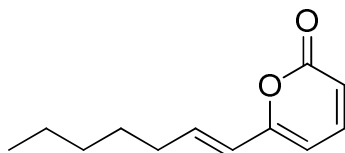
Zu einer Lösung von frisch destilliertem Säurechlorid (0.19 mol L^{-1}) in abs. Dioxan wird tropfenweise **197** (0.18 mol L^{-1}) und anschließend 733 mg Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 6 Stunden auf 60°C erhitzt. Es wird mit ges. NH_4Cl -Lösung hydrolysiert und drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Flashgel mit 10 % KF (w/w) liefert die Alkenylpyrone als gelbe Flüssigkeiten.

(E)-6-(Pent-1-en-1-yl)-2H-pyran-2-on (180)

Ausbeute: 12 % (0.21 g, 1.3 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.18$; **GC (HP-5):** $I = 1544$; **$^1\text{H NMR}$** (300 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.94$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^1J_{\text{C,H}} = 125.2 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 1.50 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, 2 H, CH_2), 2.20 (dq $^3J_{\text{H,H}} = 7.3 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.5 \text{ Hz}$, 2 H, CH_2), 5.97-6.03 (m, 2 H, CH_2), 6.17 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 9.3 \text{ Hz}$ 1 H, CH), 6.70 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 15.6 \text{ Hz}$, 1 H, CH), 7.29 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 9.4 \text{ Hz}$, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (75 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.6$ (CH_3), 21.8 (CH_2), 34.8 (CH_2), 103.0 (CH), 113.6 (CH), 139.6 (CH), 143.8 (CH), 159.7 (C), 162.0 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 164 (92) [M^+], 136 (13), 122 (83), 109 (45), 107 (97), 94 (100), 79 (44), 77 (43), 66 (8), 55 (21), 50 (7), 39 (55).

(E)-6-(Pent-2-en-1-yl)-2H-pyran-2-on (213)

Ausbeute: 0.4 % GC (0.006 g, 0.4 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.19$; **GC (HP-5):** $I = 1467$ **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 164 (36) [M^+], 149 (1), 136 (5), 107 (17), 95 (100), 79 (8), 77 (11), 67 (3), 39 (26).

(E)-6-(Hept-1-en-1-yl)-2H-pyran-2-on (214)

Ausbeute: 12 % (0.178 g, 0.9 mmol); **DC** (Hexan/Ethylacetat 8:1): $R_f = 0.24$; **GC (HP-5):** $I = 1744$; **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$, TMS): $\delta = 0.9$ (t, $^3J_{H,H} = 7.38$ Hz, $^1J_{C,H} = 132.6$ Hz, 3 H, CH_3), 1.25-1.37 (m, 4 H, 2 x CH_2), 1.42-1.51 (m, 2 H, CH_2), 2.22 (dt $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.4$ Hz, 2 H, CH_2), 5.97 (d, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, 1 H, CH), (dt, $^3J_{H,H} = 15.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 1 H, CH), 6.17 (d, $^3J_{H,H} = 9.3$ Hz, 1 H, CH), 6.71 (dt, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 15.6$ Hz, 1 H, CH), 7.29 (dd, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.3$ Hz, 1 H, CH) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, TMS): $\delta = 13.9$ (CH_3), 22.4 (CH_2), 28.3 (CH_2), 31.3 (CH_2), 32.7 (CH_2), 103.0 (CH), 113.6 (CH), 121.5 (CH), 139.9 (CH), 143.8 (CH), 159.7 (C), 162.0 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 192 (31) [M^+], 164 (2), 147 (4), 135 (8), 122 (50), 107 (35), 94 (100), 77 (57), 66 (10), 39 (75); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{max} = 231$ ($\epsilon = 5531$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$), 325 ($\epsilon = 4210$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3434$ (w), 2957 (w), 2928 (s), 2858 (w), 1726 (vs), 1648 (s), 1537 (s), 1461 (w), 1095 (s), 974 (w), 908 (w), 878 (w), 796 (s), 728 (w), 549 (w) cm $^{-1}$.

2.16 Darstellung von 6-Alkyl-2*H*-pyronen und -pyronbromiden mittels Goldkatalyse^[175]

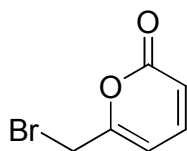
In einem sealed tube werden Propiolsäure (95 mg, 1.36 mmol), das entsprechende Alkin bzw. Alkynylbromid (6.8 mmol, 5 Äquiv.) und AuCl(PPh₃) (0.068 mmol, 0.05 Äquiv.) in 6 mL abs. Dichlormethan vorgelegt. Nach Zugabe von AgOTf (0.068 mmol, 0.05 Äquiv.) wird das Gefäß umgehend geschlossen und zur Darstellung der 6-Alkyl-2*H*-pyrone für 8 Stunden bei 50°C, bzw. für die Synthese der 6-Alkyl-2*H*-pyronbromide für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktionszeit wird das Lösemittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt.

6-Propyl-2*H*-pyran-2-on (211): Ausbeute: 124 mg (0.9 mmol, 66 %).

6-Pentyl-2*H*-pyran-2-on (179): Ausbeute: 137 mg (0.82 mmol, 61 %).

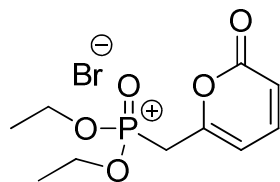
6-Heptyl-2*H*-pyran-2-on (212): Ausbeute: 232 mg (1.19 mmol, 88 %).

6-Bromomethyl-2*H*-pyran-2-on (250)



Ausbeute: 41 % (105 mg, 0.56 mmol); DC (Pentan/Diethylether 1:2): $R_f = 0.21$; **GC (BPX5):** $I = 1729$; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 4.17$ (s, 2 H, CH₂), 6.28-6.31 (m, 2 H, 2 x CH), 7.30 (dd, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 9.2$ Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 26.7$ (CH₂), 104.8 (CH), 116.2 (CH), 142.8 (CH), 159.3 (C), 161.1 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) 188 (1) [M⁺], 162 (2), 146(3), 109 (18), 95 (60), 81 (90), 79 (27), 62 (14), 53 (73), 42 (34), 39 (100); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\max} = 300$ ($\epsilon = 6788$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu}$ 3077 (w), 3045 (w), 2985 (w), 1717 (s), 1631 (s), 1552 (s), 1444 (w), 1408 (w), 1356 (m), 1243 (m), 1208 (m), 1178 (m), 1092 (s), 983 (m), 918 (m), 874 (m), 849 (m), 802 (s), 724 (m), 678 (m), 562 (s), 546 (s) cm⁻¹.

2.17 Darstellung von Diethyl-((2-oxo-2H-pyran-6-yl)-methyl)-phosphoniumbromid (251)



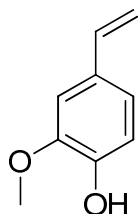
Es werden das Pyronoylbromid (**250**) (357 mg, 1.9 mmol, 1 Äquiv.) und Triethylphosphit (316 mg, 1.9 mmol, 1 Äquiv.) zusammen gegeben und 3 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Flashgel (CH₂Cl₂ : MeOH, 10:1) gereinigt. Es werden 422 mg (1.3 mmol, 68%) des Phosphonats als gelbes Öl erhalten. **DC** (CH₂Cl₂/MeOH 10:1): *R_f* = 0.44; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 1.34 (t, ³*J_{H,H}* = 7.1 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 3.08 (d, ²*J_{H,P}* = 22.0 Hz, 2 H, CH₂), 4.11-4.21 (m, 4 H, 2 x CH₂), 6.21 - 6.24 (m, 2 H, 2 x CH), 7.30 (dd, ³*J_{H,H}* = 6.6 Hz, ³*J_{H,H}* = 9.4 Hz, 1H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 16.2 (d, ²*J_{C,P}* = 6.0 Hz, 2 x CH₃), 32.3 (d, ¹*J_{C,P}* = 39.3 Hz, 2 x CH₂), 62.7 (d, ²*J_{C,P}* = 6.6 Hz, 2 x CH₂), 105.2 (d, *J_{C,P}* = 8.2 Hz, CH), 114.0 (d, *J_{C,P}* = 3.7 Hz, CH), 143.4 (d, *J_{C,P}* = 3.7 Hz, CH), 156.8 (d, ²*J_{C,P}* = 10.0 Hz, C_q), 161.7 (C_q) ppm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 3084 (w), 2984 (w), 2911 (w), 1724 (s), 1635 (m), 1554 (m), 1445 (w), 1394 (w), 1356 (w), 1241 (m), 1202 (w), 1163 (w), 1087 (w), 1016 (s), 961 (s), 806 (m), 779 (m), 738 (m), 642 (w) cm⁻¹.

2.18 Die HORNER-WADSWORTH-EMMONS Reaktion zu 180 und 214

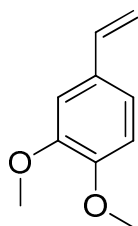
Zu einer Lösung von Diisopropylamin (137 mg, 1.36 mmol, 1.05 Äquiv.) in abs. THF (4 mL) wird bei 0°C eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 0.85 mL, 1.36 mmol, 1.05 Äquiv.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 45 min bei 0°C gerührt. Bei -78°C wird das Phosphonat (**251**) (0.41 g, 1.28 mmol, 1 Äquiv.) in abs. THF zugetropft. Es wird für eine weitere Stunde bei < -20°C gerührt. Nach Abkühlen auf -78°C wird zur Darstellung von **180** frisch destillierter Butyraldehyd (121 mg, 1.68 mmol, 1.3 Äquiv.) bzw. zur Darstellung von **214** frisch destilliertes Hexanal (168 mg, 1.68, 1.3 Äquiv.) zur Reaktionsmischung zugetropft. Es wird über Nacht gerührt und man lässt auf RT auftauen. Die Reaktion wird mit H₂O hydrolysiert und die wässrige Phase 3 Mal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung an Flashgel liefert **180** (152 mg, 0.93 mmol, 73 %) und **214** (169 mg, 0.88 mmol, 69 %) als gelbe Öle. Die Produkte **180** und **214** zeigen die gleichen spektroskopischen Daten wie bereits in 2.15 beschrieben.

2.19 Die KNOEVENAGEL Kondensation^[195] zu 2-Methoxy-4-vinylphenol (**254**)



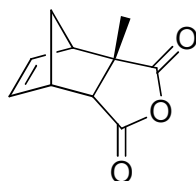
Zu einer Lösung von Vanillin (0.25 mol L^{-1}) und Malonsäure (1 mol L^{-1}) in Pyridin wird DBU (0.25 mol L^{-1}) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 4 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird mit 40 mL Toluol verdünnt und das Lösemittel unter reduziertem Druck bei 40°C entfernt. Um Spuren von Pyridin zu beseitigen, werden erneut 20 mL Toluol zugegeben und das Lösemittel abgetrennt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel gereinigt und liefert 0.42 g (2.8 mmol, 28%) einer leicht gelben Flüssigkeit als Produkt. **DC** (Hexan/Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.28$; **GC (HP-5)**: $I = 1318$; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 3.90$ (s, $^1J_{\text{C,H}} = 91.8 \text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 5.12 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 10.9 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H,H}} = 0.9 \text{ Hz}$, 1 H, CH_2), 5.58 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 17.5 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{H,H}} = 0.9 \text{ Hz}$, 1 H, CH_2), 5.68 (s br, 1 H, OH), 6.63 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 17.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 10.8 \text{ Hz}$, 1H, CH), 7.56 (tt, $^3J_{\text{H,H}} = 7.45 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 1.33 \text{ Hz}$, 1 H, CH), 8.06 – 8.09 (m, 2 H, 2 x CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 55.8$ (CH_3), 108.0 (CH), 111.4 (CH_2), 114.3 (CH), 120.0 (CH), 130.2 (C), 136.6 (CH), 145.6 (C), 146.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 150 (100) [M^+], 135 (84), 107 (38), 89 (6), 77 (38), 63 (7), 51 (10), 39 (7); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 222$ ($\epsilon = 5540 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 228 ($\epsilon = 9234 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 264 ($\epsilon = 11156 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3508$ (w, br), 3443 (w), 3086 (w), 3005 (w), 2939 (w), 2843 (w), 1594 (s), 1511 (s), 1462 (s), 1430 (s), 1417 (s), 1366 (s), 1267 (s), 1235 (s), 1204 (s), 1181 (s), 1151 (s), 1120 (s), 1029 (s), 988 (s), 900 (s), 854 (s), 820 (s), 790 (s), 552 (s) cm^{-1} .

2.20 Darstellung von 3,4-Dimethoxystyrol (215)^[258]

Zu einer Lösung von **254** (0.3 g, 2 mmol, 1 Äquiv.) und NaOH (0.32 g, 8 mmol, 4 Äquiv.) in DMSO (4 mL) wird Methyljodid (0.57 g, 4 mmol, 2 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 1.5 Std. bei RT gerührt. Es wird mit H₂O verdünnt und 3 Mal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wässriger NaOH-Lösung (2 N) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt und liefert 0.29 g (1.77 mmol, 88 %) des gewünschten Produkts als farblose Flüssigkeit mit nelkigem Geruch. **DC** (Pentan/Diethylether 4:1): *R_f* = 0.29; **GC (HP-5)**: *I* = 1366; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 3.87 (s, ¹*J*_{C,H} = 144.3 Hz, 3 H, CH₃), 3.89 (s, ¹*J*_{C,H} = 144.2 Hz, 1 H, CH₂), 5.14 (dd, ³*J*_{H,H} = 10.9 Hz, ²*J*_{H,H} = 0.9 Hz, ¹*J*_{C,H} = 160.6 Hz, 1 H, CH₂), 5.61 (dd, ³*J*_{H,H} = 17.5 Hz, ²*J*_{H,H} = 0.9 Hz, ¹*J*_{C,H} = 153.9 Hz, 1 H, CH₂), 6.64 (dd, ³*J*_{H,H} = 17.5 Hz, ³*J*_{H,H} = 10.9 Hz, 1 H, CH), 6.93 (dd, ⁴*J*_{H,H} = 2.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 8.0 Hz, 1 H, CH), 6.95 (dd, ⁴*J*_{H,H} = 2.0 Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 55.7 (CH₃), 55.8 (CH₃), 108.5 (CH), 111.0 (CH), 111.7 (CH₂), 119.4 (CH), 130.6 (C), 136.4 (CH), 148.90 (C), 148.93 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): *m/z* (%) = 164 (100) [M⁺], 149 (35), 121 (16), 103 (20), 91 (32), 77 (25), 65 (6), 51 (7); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 229 (ϵ = 12601 L mol⁻¹ cm⁻¹), 267 (ϵ = 12508 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 3084 (w), 3001 (w), 2956 (w), 2935 (w), 2836 (w), 1602 (s), 1580 (s), 1511 (vs), 1461 (s), 1416 (s), 1331 (w), 1259 (vs), 1234 (vs), 1154 (s), 1137 (vs), 1024 (vs), 989 (s), 899 (s), 854 (s), 810 (s), 764 (s), 612 (w), 560 (s), 543 (s) cm⁻¹.

2.21 Die DIELS-ALDER-Reaktion

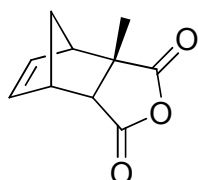
(3a*S*,4*R*,7*S*,7a*R*)-3a-Methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1,3-dion (+)-288



Von einer 0.5 M Lösung von (*S*)-(-)-*o*-Tolyloxazaborolidinlösung (12.5 mL, 6.25 mmol) in Toluol wird das Lösemittel im Vakuum entfernt. Dem Rückstand werden 10 mL abs. Toluol zugegeben und diese werden erneut im Vakuum abdestilliert. Der weiße, kristalline Rückstand wird in 15 mL abs. Toluol gelöst und es wird auf -25°C abgekühlt. Der Lösung wird Bistrifluormethansulfonimid (1.41 g, 5.01 mmol, 0.5 Äquiv.) in 10 mL abs. Toluol zugegeben, und es wird für 45 min bei -25°C gerührt. Bei -78°C wird frisch destilliertes Cyclopentadien (16.5 g, 250 mmol, 10 Äquiv.) innerhalb von 30 min zur Reaktionsmischung zugetropft. Anschließend wird eine Lösung von Citraconsäureanhydrid (2.8 g, 25 mmol) in 10 mL abs. CH_2Cl_2 und 15 mL abs. Toluol innerhalb von 2 Stunden zur Reaktionsmischung zugetropft, wobei die Temperatur der Lösung -40°C nicht übersteigen soll. Die entstehende grün milchige Lösung wird für 63 Stunden bei -78°C gerührt. Es werden 100 mL Diethylether zugefügt und man lässt auf RT aufwärmen. Die Lösung wird durch ein Celite Pad filtriert und das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt. Es werden 3.74 g (21 mmol, 84 %, 52 % *ee*) des Produkts als weißer Feststoff erhalten. **Drehwert:** $[\alpha]_{\text{D}}^{24.9} = +4.9$ ($c = 3.1$ M, CH_2Cl_2) **DC** (Hexan/Ethylacetat 5:1): $R_f = 0.18$; **GC (BPX5):** $I = 1431$; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.62$ (s, 3 H, CH_3), 1.80 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, 1 H, CH_2), 1.84 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1 H, CH_2), 3.03 – 3.04 (m, 1 H, CH), 3.13 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, 1H, CH), 3.44 – 3.47 (m, 1 H, CH), 6.29 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1 H, CH), 6.38 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 21.0$ (CH_3), 46.4 (CH), 50.8 (CH_2), 51.7 (CH), 53.2 (CH), 53.5 (C_q), 134.9 (CH), 137.0 (CH), 170.6 (CO), 174.6 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 178 (<1) $[\text{M}]^+$, 133 (1), 119 (2), 106 (6), 91 (25), 77 (9), 66 (100), 51 (9),

39 (24); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 58 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR** (**ATR**): $\tilde{\nu} = 3079$ (w), 2989 (w), 1850 (m), 1769 (s), 1458 (w), 1218 (m), 1165 (m), 1014 (s), 895 (s), 739 (s) cm^{-1} .

***rac*-(3a*S**,4*R**,7*S**,7a*R**)-3a-Methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1,3-dion (*rac*-**288**)**

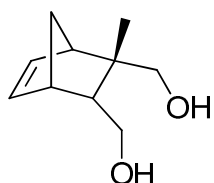


Zu einer Lösung von Citraconsäureanhydrid (**287**, 5.1 g, 51 mmol, 1.0 Äquiv.) in Chloroform (90 mL) wird frisch destilliertes Cyclopentadien (**286**, 4.7 mL, 57 mmol, 1.1 Äquiv.) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wird unter Lichtausschluß für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Umkristallisation des Rückstands in Methanol liefert *rac*-**288** (13.8 g, 84 mmol, 81 %) als weißen Feststoff. Das Produkt liefert die gleichen spektroskopischen Daten wie unter 2.21 zur Darstellung von(+)-**288** aufgeführt.

2.22 Reduktion

Darstellung von

((1*R,2*S**,3*R**,4*S**)-2-Methylbicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-diyl)dimethanol (*rac*-**289**)**



Zu einer Suspension von LiAlH_4 (6.98 g, 39.2 mmol, 1.3 Äquiv.) in THF wird bei 0°C eine Lösung des Dions (**288**) in THF zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird zunächst mit Wasser und dann mit 6 N HCl hydrolisiert. Die wässrige Phase wird 3 Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird aus wenig Diethylether umkristallisiert. Es werden 5.11 g (31 mmol, 81 %) des gewünschten Diols als weißer Feststoff erhalten. **GC (BPX5, MSTFA):** $I = 1509$; **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.31$ (s, 3 H, CH_3), 1.37 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 1 H, CH), 1.71 (dt, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, 1 H, CH_2), 2.06 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.6$ Hz, 1 H, CH_2), 2.33 (br s, 1 H, CH), 2.70 (br s, 1 H, CH) 3.29 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 11.2$ Hz, 1 H, CH_2), 3.34 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 10.4$ Hz, 1 H, CH_2), 3.56 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 11.0$ Hz, 1 H, CH_2), 3.62 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, 1 H, CH_2), 3.97 (br s, 2 H, 2 x OH), 6.03 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, 1 H, CH), 6.12 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$, $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1 H, CH), ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 26.8$ (CH_3), 46.6 (C_q), 46.8 (CH), 47.4 (CH_2), 52.8 (CH), 53.3 (CH), 64.5 (CH_2), 67.7 (CH_2), 133.9 (CH), 136.3 (CH) ppm; **EI-MS** (MSTFA) (70 eV): m/z (%) = 312 (<1) [M^+], 297 (1), 245 (18), 222 (8), 209 (30), 191 (5), 156 (37), 143 (59), 132 (21), 119 (11), 103 (11), 91 (12), 73 (100), 45 (10); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 221$ ($\epsilon = 4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), $= 227$ ($\epsilon = 12 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR** (**ATR**): $\tilde{\nu} = 3244$ (br), 3063 (w), 2965 (m), 1487 (w), 1335 (w), 1081 (w), 1028 (s), 1009 (m), 813 (m), 729 (s) cm^{-1} .

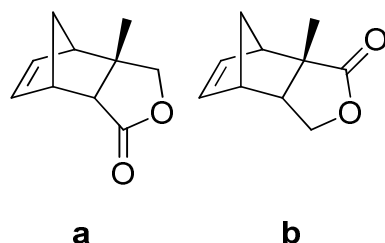
Darstellung von

((1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)-2-Methylbicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-diyl)dimethanol ((-)-**289**)

Zur Darstellung von (-)-**289** wurde die gleiche Prozedur angewandt wie zur Synthese von *rac*-**289**. Die Verbindung (-)-**289** wurde aus (+)-**288** hergestellt und liefert die gleichen spektroskopischen Daten wie *rac*-**289**. **Drehwert:** $[\alpha]_{\text{D}}^{24.9} = -5.8$ ($c = 3.3 \text{ M}$, CH_2Cl_2).

2.23 Die LEY-Oxidation

Darstellung von **(3a*S**,4*R**,7*S**,7a*R**)-3a-methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-on** (*rac*-**290a** und **b**)

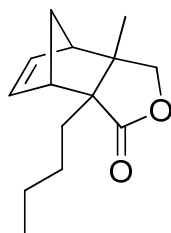


Zu einer Suspension von TPAP (0.51 g, 1.4 mmol, 0.05 Äquiv.), NMO (6.8 g, 58 mmol, 2 Äquiv.) und zerstoßenem Molsieb 6 Å in 80 mL CH₂Cl₂ wird bei 0°C das Diol (**289**) (4.88 g, 29 mmol) in 20 mL abs. CH₂Cl₂ zugetropft. Der Verlauf der Reaktion wird mittels DC überprüft. Die Reaktionsmischung wird bei RT so lange gerührt, bis das Starmaterial verbraucht ist. Das Rohprodukt wird über Silicagel filtriert und es wird mit EtOAc nachgespült. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Flashgel aufgereinigt. Es werden 3.15 g (19.2 mmol, 66 %) der Lactone als nicht trennbare Regioisomere *rac*-**290a** und *rac*-**290b** erhalten. Regioisomer *rac*-**290a**: **DC** (Hexan/Ethylacetat (2:1): *R_f* = 0.39; **GC (BPX5)**: *I* = 1416; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 1.43 (s, 3 H, CH₃), 1.72 – 1.76 (m, 2 H, CH₂), 2.78 (d, ³*J*_{H,H} = 4.6 Hz, 1 H, CH), 3.29 – 3.31 (m, 1 H, CH), 3.89 (d, ²*J*_{H,H} = 9.7 Hz, 1 H, CH₂), 3.92 (d, ²*J*_{H,H} = 9.7 Hz, 1 H, CH₂), 6.29 (dd, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 3.0 Hz, 1 H, CH), 6.36 (dd, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 3.1 Hz, 1 H, CH) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 26.3 (CH₃), 46.1 (CH), 46.9 (C_q), 50.3 (CH₂), 52.3 (CH), 55.4 (CH), 77.0 (CH₂), 136.2 (CH), 136.9 (CH), 178.1 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): *m/z* (%) = 164 (<1) [M]⁺, 105 (3), 99 (14), 91 (11), 77 (6), 66 (100), 51 (7), 39 (19); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 229 (ε = 1203 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: ν̃ = 3066 (w), 2982 (w), 1746 (s), 1455 (w), 1389 (m), 1234 (m), 1115 (s), 986 (s), 728 (s), 703 (s) cm⁻¹. Regioisomer **290b**: **DC** (Hexan/Ethylacetat (2:1): *R_f* = 0.39; **GC (BPX5)**: *I* = 1451; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 1.51 (s, 3 H, CH₃), 1.69 (q, ⁴*J*_{H,H} = 1.4 Hz, 2 H, CH₂), 2.65 (ddd, ³*J*_{H,H} = 8.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 4.0 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.1 Hz, 1 H, CH), 2.83 – 2.85 (m, 1 H, CH), 3.03 – 3.05 (m, 1 H, CH), 3.75 (dd, ²*J*_{H,H} = 9.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 3.1 Hz, 1 H, CH₂), 4.27 (dd, ²*J*_{H,H} = 9.8 Hz, ³*J*_{H,H} = 8.7 Hz, 1 H, CH₂), 6.26 (dd, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 3.0 Hz, 1 H, CH), 6.33 (dd,

$^3J_{\text{H,H}} = 5.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 3.0 \text{ Hz}$, 1 H, CH) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 22.5$ (CH_3), 46.7 (CH), 47.7 (CH), 49.6 (CH_2), 51.9 (CH), 53.6 (C_q), 68.8 (CH_2), 134.1 (CH), 138.2 (CH), 180.9 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 164 (<1) [M^+], 103 (4), 99 (17), 91 (21), 77 (21), 66 (100), 51 (21), 39 (63); **HR-EIMS**: Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2^+$, 164.08318, gefunden 164.08441; **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 43 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3065$ (w), 2970 (m), 2909 (w), 2875 (w), 2251 (w), 1752 (s), 1479 (w), 1461 (w), 1387 (w), 1334 (w), 1253 (w), 1233 (w), 1191 (m), 1154 (w), 1096 (w), 1024 (m), 991 (m), 963 (w), 916 (m), 893 (w), 846 (w), 797 (w), 730 (s), 703 (m), 651 (m), 617 (w), 595 (w), 555 (w) cm^{-1} .

2.24 Alkylierungen

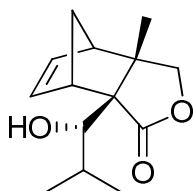
Darstellung von (3aS*,4R*,7S*,7aS*)-7a-butyl-3a-methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3H)-on (rac-291)



Zu einer Lösung von Diisopropylamin (1.49 g, 14.8 mmol, 1.5 Äquiv.) in abs. THF (80 mL) wird bei 0°C eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 9.3 mL, 14.8 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 1 Std. bei 0°C gerührt und anschließend auf –78°C abgekühlt. Es wird eine Lösung der 1:1 Mischung von (*rac*)-**290a** und **b** (1.62 g, 9.83 mmol, 1.0 Äquiv., wobei die Mischung ca. 5.9 mmol (*rac*)-**290a** enthält) in THF (10 mL) zugefügt und für weitere 2 Std. bei < –40°C gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf –78°C wird Butyliodid (3.24g, 17.7 mmol, 1.8 Äquiv.) zugetropft. Die Mischung wird über Nacht gerührt und man lässt auf RT aufwärmen. Die Reaktion wird mit ges. NH_4Cl -Lösung gequencht. Die wässrige Phase wird drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an Flashgel (Pentan/Diethylether 1:1) liefert (*rac*)-**291** (1.15 g, 5.24 mmol, 88 %) als farbloses Öl. **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.63$; **GC (BPX5)**: $I = 1742$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{H,H}} =$

7.2 Hz, 3 H, CH₃), 1.31 (s, 3 H, CH₃), 1.33 (sext, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2 H, CH₂), 1.38 – 1.51 (m, 2 H, 2x CH₂), 1.57 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 1 H, CH₂), 1.65 (ddd, $^2J_{\text{H,H}} = 14.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 11.1$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz, 1 H, CH₂), 1.76 – 1.87 (m, 2 H, 2 x CH₂), 2.63 – 2.64 (m, 1 H, CH), 2.87 – 2.89 (m, 1 H, CH), 3.76 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 10.7$ Hz, 1 H, CH₂), 3.89 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 9.6$ Hz, 1 H, CH₂), 6.29 – 6.30 (m, 2 H, 2 x CH) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 13.8$ (CH₃), 22.9 (CH₃), 23.4 (CH₂), 28.3 (CH₂), 33.1 (CH₂), 47.9 (CH₂), 48.4 (C_q), 52.4 (CH), 54.6 (CH), 58.9 (C_q), 76.0 (CH₂), 135.4 (CH), 138.2 (CH), 180.3 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 220 (< 1) [M⁺], 155 (72), 150 (2), 125 (2), 112 (9), 105 (5), 91 (18), 77 (15), 66 (100), 55 (14), 32 (32); **HR-EIMS**: Berechnet für C₁₄H₂₀O₂⁺, 220.14578, gefunden 220.14745; **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 58$ L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3065$ (w), 2959 (m), 2904 (w), 2874 (w), 2251 (w), 1753 (s), 1468 (w), 1391 (w), 1376 (w), 1330 (w), 1279 (w), 1239 (w), 1211 (w), 1187 (w), 1157 (w), 1120 (w), 1080 (m), 1028 (m), 910 (m), 731 (s), 706 (m), 635 (w), 544 (w) cm⁻¹.

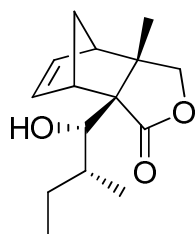
Darstellung von (3a*S*,4*R*,7*S*,7a*R*)-7a-((*S*)-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3a-methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3*H*)-on ((+)-292**)**



Zu einer Lösung von Diisopropylamin (303 mg, 3 mmol, 1.5 Äquiv.) in abs. THF (10 mL) wird bei 0°C eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 1.9 mL, 3 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 1 Std. bei 0°C gerührt und anschließend auf -78°C abgekühlt. Eine Lösung von **290a** und **290b** (656 mg, 2 mmol, 1.0 Äquiv., wobei die Mixtur ca. 1 mmol von **290a** enthält) in THF (4 mL) wird zugefügt und es wird für weitere 2 Std. bei < -40°C gerührt. Nach Abkühlen auf -78°C wird frisch destillierter Isobutyraldehyd (259 mg, 3.6 mmol, 1.8 Äquiv.) der Reaktionsmischung zugetropft. Es wird weiter gerührt und man lässt über Nacht auf RT aufwärmen. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung gequencht und die wässrige Phase 3 Mal mit Diethylether extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel (Pentan : Diethylether 1:1) aufgereinigt und liefert 193 mg (0.82 mmol, 82 %) (+)-**292** als farblosen Feststoff. **DC** (Pentan/Diethylether 5:1): $R_f = 0.34$; **Schmelzpunkt**: 108°C ; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} = +53.5$ ($c = 1.2$ M, CH_2Cl_2); **GC (BPX5)**: $I = 1836$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 1.05$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 1.43 (s, 3 H, CH_3), 1.58 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.6$ Hz, 1 H, CH_2), 1.73 (dt, $^2J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.4$ Hz, 1 H, CH_2), 1.85 (br m, 1 H, OH), 2.50 (dsept, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1H, CH), 3.14 (br m, 1 H, CH), 2.65 (br m, 1 H, CH), 3.61 (br m, 1H, CH), 3.80 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, 1 H, CH_2), 3.88 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, 1 H, CH_2), 6.29 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, 1 H, CH), 6.37 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 17.7$ (CH_3), 22.8 (CH_3), 23.3 (CH_3), 29.8 (CH), 48.0 (CH_2), 48.8 (CH), 49.8 (C_q), 54.0 (CH), 64.8 (C_q), 75.9 (CH_2), 76.7 (CH), 136.9 (CH), 138.0 (CH), 178.9 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 218 (<1) $[\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}]$, 171 (4), 153 (25), 127 (22), 107 (14), 91 (23), 77 (19), 66 (100), 53 (21), 43 (61); **HR-EIMS**: Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2^+$ ($[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 218.13013, gefunden 218.13329; **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 228$ ($\epsilon = 67$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 3474$ (w, br), 2960 (m), 2875 (w), 1733 (s), 1465 (m), 1390 (m), 1328 (w), 1294 (w), 1256 (w), 1226 (w), 1188 (w), 1160 (m), 1119 (m), 1030 (m), 1002 (m), 928 (w), 906 (w), 889 (w), 802 (w), 740 (m), 710 (m), 646 (m), 626 (m), 584 (m), 550 (m) cm $^{-1}$.

Darstellung von (3aR,4S,7R,7aS)-7a-((1S,2S)-1-Hydroxy-2-methylbutyl)-3a-methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3H)-on ((1S,2S)-293) und (3aR,4S,7R,7aS)-7a-((1R,2S)-1-Hydroxy-2-methylbutyl)-3a-methyl-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoisobenzofuran-1(3H)-on ((1R,2S)-293)



Zu einer Lösung von Diisopropylamin (303 mg, 3 mmol, 1.5 Äquiv.) in abs. THF (10 mL) wird bei 0°C eine Lösung von *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 1.9 mL, 3 mmol, 1.5 Äquiv.)

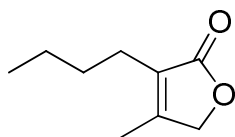
zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 1 Std. bei 0°C gerührt und anschließend auf –78°C abgekühlt. Eine Lösung von enantiomeren angereichertem **290a** und **290b** (656 mg, 2 mmol, 1.0 Äquiv., wobei die Mixtur ca. 1 mmol von **290a** enthält) in THF (4 mL) wird zugefügt und es wird für weitere 2 Std. bei < -40°C gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf –78°C wird frisch synthetisiertes und destilliertes (*S*)-2-Methylbutanal (310 mg, 3.6 mmol, 1.8 Äquiv.), erhalten aus der Oxidation von (*S*)-2-Methylbutan-1-ol mit TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl) / NaOCl, zugetropft. Die Reaktionsmischung wird weiter gerührt und man lässt über Nacht auf RT aufwärmen. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung gequencht und die wässrige Phase 3 Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel (Pentan : Diethylether 1:1) aufgereinigt. Es werden 125 mg (0.5 mmol, 50 %) einer Mischung der Diastereomere (1*S*,2*S*)- und (1*R*, 2*S*)-**293** (48% *de*) als farbloser Feststoff erhalten. **Schmelzpunkt** = 79 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{21.3} = +41.2$ (*c* = 1.3 M, CH₂Cl₂); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): *R_f* = 0.44; **GC (BPX5)**: *I* = 1929; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 0.97 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.3 Hz, 3 H, CH₃ des minor Diast.), 0.98 (t, $^3J_{H,H}$ = 7.4 Hz, 3 H, CH₃ des major Diast.), 1.02 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.7 Hz, 3 H, CH₃ des major Diast.), 1.08 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.9 Hz, 3 H, CH₃ des minor Diast.), 1.24 – 1.35 (m, 1 H, CH₂ des major Diast.), 1.431 (s, 3 H, CH₃ des major Diast.), 1.435 (s, 3 H, CH₃ des minor Diast.), 1.38 – 1.51 (m, 1 H, CH₂ des minor Diast.), 1.56 – 1.61 (m, 1 H, CH₂ beider Diast.), 1.70 (br d, $^2J_{H,H}$ = 8.9 Hz, 1 H, CH₂ des minor Diast.), 1.76 (br d, $^2J_{H,H}$ = 8.9 Hz, 1 H, CH₂ des major Diast.), 1.86 – 2.04 (m, 2 H, CH₂ und OH beider Diast.), 2.17 – 2.31 (m, 1 H, CH beider Diast.), 2.65 (br m, 1 H, CH beider Diast.), 3.06 (br m, 1 H, CH des minor Diast.), 3.12 (br m, 1 H, CH des major Diast.), 3.66 (d, $^3J_{H,H}$ = 6.0 Hz, 1 H, CH des major Diast.), 3.69 (d, $^3J_{H,H}$ = 4.5 Hz, 1 H, CH des minor Diast.), 3.80 (d, $^2J_{H,H}$ = 9.3 Hz, 1 H, CH₂ beider Diast.), 3.88 (d, $^2J_{H,H}$ = 9.3 Hz, 1 H, CH₂ beider Diast.), 6.29 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5.6 Hz, $^4J_{H,H}$ = 3.0 Hz, 1 H, CH beider Diast.), 6.37 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5.6 Hz, $^4J_{H,H}$ = 3.0 Hz, 1 H, CH beider Diast.) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 11.6/11.7 (CH₃), 14.0/18.8 (CH₃), 23.25/23.28 (CH₃), 24.2/29.6 (CH₂), 36.2/36.3 (CH), 48.0/48.1 (CH₂), 48.7/49.0 (CH), 49.8/50.0 (C_q), 54.0/54.1 (CH), 64.8/64.9 (C_q), 75.9 (CH₂), 74.7/77.0 (CH), 136.9 (CH beider Diastereomere), 137.9/138.0 (CH), 178.9/179.0 (CO des Haupt/Nebendiastereomer) ppm; **EI-MS** (70 eV): *m/z* (%) = 250 (<1) [M⁺], 199 (5), 185 (11), 167 (88), 127 (49), 110 (11), 91 (21), 77 (16), 66 (100), 53 (10), 41 (22); **HR-EIMS**: Berechnet für C₁₀H₁₇O₃⁺ ([M–C₅H₅]⁺), 185.11722, gefunden 185.11806; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 3470 (w, br), 2963 (m), 2932 (w), 2875 (w),

1731 (s), 1462 (m), 1379 (m), 1329 (w), 1294 (w), 1255 (w), 1222 (w), 1189 (w), 1162 (m), 1136 (w), 1115 (w), 1058 (w), 1029 (m), 1004 (m), 907 (w), 887 (w), 857 (w), 808 (w), 742 (m), 710 (m), 645 (m), 625 (m), 551 (m) cm^{-1} . Die Synthese einer 1:1 Mischung von (*rac*)-**293** wurde ausgehend von (*rac*)-**290a** und **b** und (*S*)-2-Methylbutanal wie oben beschrieben durchgeführt. Das Produkt liefert die gleichen spektroskopischen Daten wie oben aufgeführt.

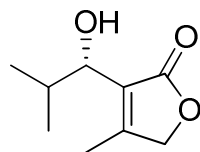
2.25 *retro*-DIELS-ALDER Reaktion

Das Startmaterial wird in *o*-Dichlorbenzol gelöst und für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird das Produkt mittels Säulenchromatographie an Flashgel (Pentan \rightarrow Pentan:Et₂O (1:1)) aufgereinigt. Die Lactone werden als klare Öle mit kokosartigem Geruch erhalten.

3-Butyl-4-methylfuran-2(5H)-on (283)

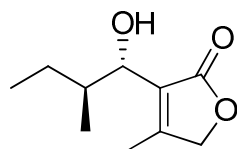


Die *retro*-DIELS-ALDER Reaktion erfolgt aus *rac*-**291** als Startmaterial **Ausbeute:** 96 % (778 mg, 5.0 mmol); **DC** (Gradient von Pentan 100 % \rightarrow Diethylether 100 %): $R_f = 0.36$; **GC (HP-5):** $I = 1388$; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 0.92$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$, $^1J_{\text{C,H}} = 124.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.28-1.36 (m, 2 H, CH₂), 1.44-1.51 (m, 2 H, CH₂), 2.03 (s, $^1J_{\text{C,H}} = 128.1$ Hz, 3 H, CH₃) 2.26 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, CH₂), 4.62 (q, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$, $^1J_{\text{C,H}} = 150.2$ Hz, 2 H, CH₂) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, TMS): $\delta = 12.1$ (CH₃), 13.7 (CH₃), 22.4 (CH₂), 23.0 (CH₂), 29.9 (CH₂), 72.3 (CH₂), 127.2 (C), 156.4 (C), 175.0 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 154 (11) [M^+], 139 (15), 125 (18), 112 (100), 110 (10), 97 (10), 93 (9), 83 (12), 77 (7), 69 (15), 67 (12), 55 (36), 51(6); **UV** (CH₂Cl₂): $\lambda_{\text{max}} = 231$ ($\epsilon = 2339 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 2957$ (w), 2931 (w), 2863 (w), 1741 (s), 1678 (m), 1449 (m), 1390 (w), 1339 (w), 1188 (w), 1087 (m), 1034 (s), 998 (m), 896 (w), 779 (m), 733 (w), 639 (w) cm^{-1} .

(-)-(S)-3-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-methylfuran-2(5H)-on ((-)-294)

Die *retro*-DIELS-ALDER Reaktion erfolgt aus (+)-**292** als Startmaterial. **Ausbeute:** 86 % (102 mg, 0.6 mmol, 56 % *ee*); **Drehwert:** $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -34.3$ ($c = 1.2$ M, CH_2Cl_2); **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.21$; **GC (BPX5):** $I = 1485$; **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.84$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.04 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 125.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.99 – 2.08 (m, 1 H, CH), 2.09 (s, 3 H, CH_3), 3.14 (br d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$ Hz, 1 H, OH), 4.15 (br s, 1 H, CH), 4.65 (br d, $^2J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 1 H, CH_2), 4.71 (br d, $^2J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 1 H, CH_2) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 12.7$ (CH_3), 18.7 (CH_3), 19.1 (CH_3), 34.1 (CH), 72.6 (CH_2), 73.0 (CH), 127.7 (C_q), 158.7 (C_q), 174.5 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 170 (< 1) $[\text{M}]^+$, 152 (4), 127 (100), 110 (31), 99 (35), 82 (34), 67 (10), 53 (21)); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 229$ ($\epsilon = 2746$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3457$ (w, br), 2966 (w), 2935 (w), 2875 (s), 1728 (s), 1466 (w), 1448 (w), 1386 (w), 1335 (w), 1254 (w), 1175 (w), 1091 (w), 1049 (m), 1007 (m), 934 (m), 916 (m), 851 (w), 789 (w), 756 (w), 723 (w) 536 (w) cm $^{-1}$.

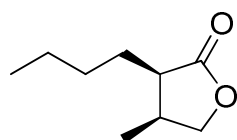
Die gleiche Prozedur wurde für die Umsetzung von *rac*-**292** zu *rac*-**294** verwendet. Das Produkt lieferte die gleichen spektroskopischen Daten wie oben aufgeführt.

3-((1S,2S)-1-Hydroxy-2-methylbutyl)-4-methylfuran-2(5H)-on ((1S,2S)-295) und 3-((1R,2S)-1-Hydroxy-2-methylbutyl)-4-methylfuran-2(5H)-on ((1R,2S)-295)

Die *retro*-DIELS-ALDER Reaktion erfolgt aus (1*S*,2*S*)-**293** und (1*R*,2*S*)-**293** als Startmaterial. **Ausbeute:** 87 % (52 mg, 0.28 mmol, 45 % *de*); **Drehwert:** $[\alpha]_{\text{D}}^{21.4} = -18.0$ ($c = 0.5$ M, CH_2Cl_2) **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_{\text{f}} = 0.23$; **GC (BPX5):** $I = 1584$; **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.79$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3 des Hauptdiastereomer), 0.91 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3 H, CH_3 des Nebendiastereomer), 0.94 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3 des Hauptdiastereomer), 1.01 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3 des Nebendiastereomer), 1.03-1.12 (m, 1 H, CH_2 des Nebendiastereomer), 1.18-1.26 (m, 1 H, CH_2 des Hauptdiastereomer), 1.34-1.42 (m, 1 H, CH_2 des Nebendiastereomer), 1.74-1.88 (m 2 H, CH_2 und CH des Hauptdiastereomer, 1 H, CH des Nebendiastereomer), 2.07 (s, 3 H, CH_3 des Hauptdiastereomer), 2.08 (s, 3 H, CH_3 des Nebendiastereomer), 2.98 (br. s, 1 H, OH beider Diastereomere), 4.20 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1 H, CH des Hauptdiastereomer), 4.29 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1 H, CH des Nebendiastereomer), 4.62-4.73 (m, 2 H, CH_2 beider Diastereomere) ppm; **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 11.0/11.5$ (CH_3), 12.48/12.50 (CH_3), 14.4/15.1 (CH_3), 24.8/25.6 (CH_2), 40.1/40.5 (CH), 71.1/71.2 (CH), 72.8 (CH_2), 127.6 (C_q beider Diastereomere) 158.01/158.04 (C_q), 174.26/174.29 ((CO Haupt- und Nebendiastereomer) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 166 (2) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 151 (4), 127 (100), 110 (40), 99 (26), 82 (38), 67 (20), 53 (41), 41 (47); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 230$ ($\epsilon = 2737$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) nm; **IR (ATR):** $\tilde{\nu} = 3451$ (w, br), 2964 (w), 2931 (w), 2876 (w), 1728 (s), 1670 (m), 1452 (w), 1384 (w), 1333 (w), 1180 (w), 1040 (m), 1006 (w), 938 (w), 906 (w), 789 (w), 721 (w), 702 (w), 593 (m) cm $^{-1}$. Die gleiche Prozedur wurde für die Umsetzung von *rac*-**293** zu *rac*-**95** verwendet. Das Produkt lieferte die gleichen spektroskopischen Daten wie oben aufgeführt.

2.26 Palladium-katalysierte Hydrierung

cis-3-Butyl-4-methyldihydrofuran-2(3*H*)-on (*cis*-**286**)

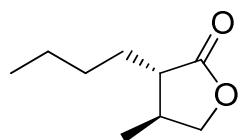


Zu einer Lösung von **283** (230 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äquiv.) in Methanol (10 mL) wird Pd/ AlO_x (10 %, 160 mg, 0.15 mmol, 0.1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird unter H_2 -Atmosphäre (40 bar) bei 60°C für 24 Std. gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird die

Mischung filtriert. Das Filtrat wird unter reduziertem Druck eingengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Flashgel (Pentan/Diethylether 1:1) gereinigt. Es werden 131 mg (0.84 mmol, 56%) des *cis*-Lactons als farbloses Öl erhalten. **DC** (Pentan/Diethylether 1:1): $R_f = 0.57$; **GC (HP-5)**: $I = 1300$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.93$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 3 H, CH_3), 1.02 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 – 1.48 (m, 5 H, 3x CH_2), 1.72 – 1.81 (m, 1 H, CH_2), 2.49 – 2.55 (m, 1 H, CH), 2.58 – 2.67 (m, 1 H, CH), 3.96 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1 H, CH_2) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 13.4$ (CH_3), 13.8 (CH_3), 22.6 (CH_2), 24.5 (CH_2), 29.7 (CH_2), 33.1 (CH), 43.7 (CH), 73.2 (CH_2), 178.8 (CO) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 232 (<1) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 185 (4), 167 (32), 127 (29), 110 (12), 99 (13), 91 (18), 77 (17), 66 (100), 57 (22), 41 (47); **UV** (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}} = 222$ ($\epsilon = 17 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 229 ($\epsilon = 35 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu} = 2959$ (w), 2935 (w), 2871 (w), 1767 (s), 1460 (w), 1370 (w), 1207 (m), 1166 (m), 1125 (m), 1087 (w), 1040 (m), 1022 (w), 986 (m), 704 (w), 604 (w) cm^{-1} .

2.27 Isomerisierungsreaktion

trans-3-Butyl-4-methyldihydrofuran-2(3*H*)-on (*trans*-287)



Natrium (62 mg, 2.6 mmol, 3.0 Äquiv.) wird in Methanol (10 mL) gelöst und *cis*-**284** (133 mg, 0.85 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit HCl (6 M) auf pH = 1-2 gebracht. Es wird mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung an Flashgel liefert *trans*-**285** als klare Flüssigkeit. **Ausbeute**: 67 % (1.76 g, 11.3 mmol); **DC** (Pentan/Diethylether 5:1): $R_f = 0.37$; **GC (HP-5)**: $I = 1272$; **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.65$ Hz, $^1J_{\text{C,H}} = 124.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.28-1.36 (m, 7 H, 4 x CH_2), 1.38-1.55 (m, 3 H, 2 x CH_2), 1.60-1.71 (m, 1 H, CH_2), 1.74-1.84 (m, 1 H, CH_2), 2.31-2.37 (m, 2 H, CH_2), 4.39-4.46 (m, 1 H, CH), 6.01 (dq, $^3J_{\text{H,H}} = 1.40$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 9.65$ Hz, 1 H, CH), 6.87-6.91 (m, 1 H, CH) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.0$ (CH_3), 22.5

(CH₂), 24.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 31.7 (CH₂), 34.8 (CH₂), 78.0 (CH), 121.3 (CH), 145.0 (CH), 164.5 (C) ppm; **EI-MS** (70 eV): m/z (%) = 232 (<1) [M⁺-H₂O], 185 (4), 167 (32), 127 (29), 110 (12), 99 (13), 91 (18), 77 (17), 66 (100), 57 (22), 41 (47); **UV** (CH₂Cl₂): λ_{max} = 228 (ε = 27 L mol⁻¹ cm⁻¹) nm; **IR (ATR)**: $\tilde{\nu}$ = 2959 (m), 2932 (w), 2862 (w), 1769 (s), 1462 (w), 1383 (w), 1336 (w), 1202 (m), 1169 (m), 1132 (m), 1081 (w), 1016 (m), 706 (w), 661 (w), 536 (w) cm⁻¹.

3. Kultivierungsbedingungen der Pilzstämmen für CLSA-Analysen

3.1 Verwendete Pilzstämmen

Für die Extraktion der flüchtigen Duftstoffe mittels der CLSA-Methode wurden folgende Stämme zur Analyse verwendet, die freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden von:

- *Trichoderma asperellum* und *Trichoderma viride*, Frau Prof. Dr. Gabriele König (Universität Bonn),
- *Geniculosporium* sp., Frau Dr. Barbara Schulz (TU Braunschweig),
- *Fusarium fujikuroi* Frau Prof. Dr. Bettina Tudzynski (Universität Münster).

3.2 Nährmedien

Die Anzucht und Inkubation der Pilzstämmen wurde in folgenden Nährmedien durchgeführt.

BM-Medium (*Trichoderma* sp.)

20 g L⁻¹ Gerstenmalzextrakt

Kartoffel-Möhre-Medium (*Geniculosporium* sp.):

20 g L⁻¹ Kartoffeln, kleingeschnitten

20 g L⁻¹ Möhren, kleingeschnitten

Kartoffeln und Möhren in 500 mL Wasser für 2 Stunden kochen, anschließend pürieren, mit Wasser auf 1 L auffüllen, Agar zufügen und autoklavieren.

CM-Medium (*Fusarium* sp.):

	50 mL L ⁻¹	Salzlösung
	1 mL L ⁻¹	Spurenelementlösung
	1 mL L ⁻¹	Vitaminlösung
	1 g L ⁻¹	Hefeextrakt
	2 g L ⁻¹	Pepton
	1 g L ⁻¹	Casamino acids
	10 g L ⁻¹	Glucose
	15 g L ⁻¹	Agar
	Mit Wasser auffüllen.	
Salzlösung:	10.4 g L ⁻¹	KCl
	10.4 g L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	30.4 g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung:	10 g L ⁻¹	FeSO ₄ · 7 H ₂ O
	50 g L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
Vitaminlösung:	500 mg L ⁻¹	Biotin
	50 g L ⁻¹	Nicotinsäure
	16 g L ⁻¹	PABA
	20 g L ⁻¹	Pyridoxal Hydrochlorid

Für die Herstellung von Agar-Platten werden den Nährmedien je 15-20 g L⁻¹ Agar-Agar nach Kobe vor dem Autoklavieren zugefügt.

3.3 Kultivierung

Jeder Stamm wird in Flüssigmedium in einem Rotationsinkubator vorinkubiert. Die Inkubationsdauer und -temperatur der Stämme ist jeweils unterschiedlich und ist der Tabelle zu entnehmen. Nach der Vorinkubation werden Agarplatten mit je 3 Stückchen Myzel beimpft. Die Inkubationszeit und -temperatur bis zur CLSA-Analyse der Duftstoffe ist wiederum der Tabelle zu entnehmen.

Stamm		<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Geniculosporium</i>	<i>Fusarium</i> sp.
Vorinkubation in	T [°C]	28	-	28
Flüssigmedium	v [r min ⁻¹]	200	-	200
	t [d]	3-4	-	5-6
Inkubation auf	T [°C]	28	22	28
Agarplatten	t [d]	0-10	20	21

Für die Zeitreihenexperimente von *T. asperellum* und *T. viride* werden 8 Agarplattenkulturen angeimpft und unterschiedlich lang inkubiert. Die erste Agarplattenkultur wird sofort nach Beimpfen in die CLSA-Apparatur eingebracht und die flüchtigen Duftstoffe gesammelt (vgl.

6.4.4). Die zweite Kultur wird vor der CLSA Analyse einen Tag bei 28°C inkubiert, die dritte Kultur wird 2 Tage bei 28°C inkubiert usw..

3.4 Extraktion der Duftstoffe mittels CLSA und GC-MS-Analyse

Die flüchtigen organischen Duftstoffe, die von den Agar Platten Kulturen freigegeben werden, werden mit der CLSA-Methode gesammelt. Dabei wird die Agarplattenkultur in ein dafür vorgesehenes Glasbehältnis gesetzt und damit in ein geschlossenes System eingebracht, durch das ein kontinuierlicher Luftstrom zirkuliert. In dieser Apparatur ist ein Glasfilter mit 30 mg Aktivkohle zwischengeschaltet, auf dem die entweichenden flüchtigen Duftstoffe von der Agarplattenkultur für 24 h gesammelt werden. Nach Ablauf der Zeit wird der Filter vorsichtig entnommen und die adsorbierten Duftstoffe mit 30 µl Dichlormethan (GC Qualität) desorbiert. Anschließend werden 2 µl des erhaltenen Extrakts umgehend mittels GC-MS analysiert und der Rest bei – 80°C aufbewahrt.

3.5 Flüssigextraktion von *Fusarium fujikuroi*

Eine 16 Tage alte Schüttelkultur wird runterzentrifugiert. Der Kulturüberstand wird entnommen und mit HCl (w = 5 %) auf pH = 2,5 angesäuert. Die wässrige Lösung wird drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und bis auf wenige Mikroliter eingengt. Der Rückstand wird mit MSTFA derivatisiert und mittels GC-MS gemessen.

3.5.1 Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern

Es werden 1 mM [1,1,2,3,3-²H₅]-Glycerol sowie [2-¹³C]-Acetat dem Medium zugesetzt. Die Kultivierung findet auf Agarplatten statt. Nach 3 Wochen Inkubation wird der Agar zerkleinert und mit EtOAc extrahiert. Der Extrakt wird über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mittels GC-MS analysiert.

4. Herstellung rekombinanter Fusionsproteine aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

4.1 Kultivierung von *B. japonicum* USDA 110

Die Kultivierung von *B. japonicum* erfolgt bei 28 °C und 80 rpm im Rotationsinkubator in YEM-Medium.

YEM-Medium (*B. japonicum* USDA 110):

0.4 g L ⁻¹	Hefeextrakt
10 g L ⁻¹	Mannitol
0.5 g L ⁻¹	KHPO ₄
0.2 g L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0.1 g L ⁻¹	NaCl
pH = 6.8	

4.2 Isolierung genomischer DNA

Es werden 10 mL einer Flüssigkultur von *B. japonicum* USDA 110 runterzentrifugiert und der wässrige Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 5 mL SET-Puffer unter Zusatz von 100 µL Lysozym-Lösung ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL Proteinase K Lösung ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) und 600 µL SDS-Lösung ($w = 10 \%$) wird leicht gemischt und für 1 Stunde bei 55°C inkubiert. Es werden 5 mL Phenol/Chloroform zugefügt, gemischt und 1 h bei 11000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Es wird das 0.6 fache Volumen Isopropanol zugegeben. Zur vollständigen Fällung der DNA wird auf Eis gekühlt. Die genomische DNA wird abgetrennt und 2 Mal mit Ethanol (70 Vol%) gewaschen. Nach Trocknen wird die genomische DNA in 300 µL TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

SET Puffer		TE Puffer	
75 mM	NaCl	10 mM	Tris HCl
25 mM	EDTA	1 mM	EDTA
20 mM	Tris HCl	pH = 8.0	
pH = 8.0			

4.3 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli* (*E.coli*)

LB Medium ^[259]	LB + Glc-Medium
10 g L ⁻¹ Trypton	10 g L ⁻¹ Trypton
5 g L ⁻¹ NaCl	5 g L ⁻¹ NaCl
10 g L ⁻¹ Hefeextrakt	10 g L ⁻¹ Hefeextrakt
	2 g L ⁻¹ Glucose
pH= 7.2	pH= 7.2

4.3.1 Antibiotika

Sofern nicht anders angegeben, werden bei Arbeiten mit dem pMAL[™]-c5X Vektor Ampicillin (Amp) in einer Arbeitskonzentration von 100 µg mL⁻¹ (Stocklösung 100 mg mL⁻¹ in H₂O) den Medien zugesetzt.

4.4 pMal[™]-c5X Vektor

Für die Klonierung der Cytochrom P450-Monooxygenasen und des Ferredoxins wird der pMAL[™]-c5X Vektor von New England Biolabs[®] Inc. (NEB) verwendet. Dieser zeichnet sich durch ein *malE* Gen aus, das für ein Maltose-bindendes-Protein (MBP) kodiert. Das amplifizierte Gen wird hinter das MBP kloniert, wodurch ein Fusionsprotein entsteht. Das MBP besitzt in späteren Aufreinigungsschritten den Vorteil der festeren Bindung an Amylose, was die Abtrennung des Zielproteins erleichtert.

4.5 Plasmidisolierung

Die Extraktion von Plasmiden wurde anhand der Herstellervorgaben des Pure Yield[™] Plasmid Miniprep System (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der Gene CYP112, CYP114, CYP117 und Ferredoxin werden folgende Primer verwendet (5'→3'):

CYP112_fwd	GTGAAGTGCCCATATGTCCGAACAA	NdeI
CYP112_rev	CGTCCGCGCATATGACCAGAGCA	NdeI
CYP114_fwd	ACAGGTAACCCATATGGACGTGCAA	NdeI
CYP114_rev	TGACGCGCGATATCGCTCCCCT	EcoRV
CYP117_fwd	GCGCTGCATATGGACATGCTGCT	NdeI
CYP117_rev	TGCGATGCCGATATCTGAGAATCCGAT	EcoRV
Ferredoxin_fwd	AGGGGAGCTCATATGCGCGTCAT	NdeI
Ferredoxin_rev	ACCGTCCCATCGATATCTCCTAGAT	EcoRV

Die PCR wird in einem 50 µL Volumen durchgeführt. Das Pipettierschema ist der Tabelle zu entnehmen.

	CYP112	CYP114	CYP117	Ferredoxin
Primer fwd [µL]	1	1	1	1
Primer rev [µL]	1	1	1	1
DMSO 50 % [µL]	4	4	4	6
genomische DNA [µL]	1	1	1	1
Pfu Polymerase [µL]	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP [µL]	5	5	5	5
H ₂ O [µL]	32.5	32.5	32.5	30.5

Die PCR wird in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Temperaturprogramme zur Amplifizierung der entsprechenden Gene sind der Tabelle zu entnehmen.

	CYP112		CYP114		CYP117		Ferredoxin	
	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]	T [°C]
Initiale Denaturierung	3	95	3	95	3	95	3	95
3-Schritt-Zyklus								
Denaturierung	0.5	95	0.5	95	0.5	95	0.5	95
Annealing	0.5	52.0	0.5	52.8	0.5	52.8	0.5	52.8
Extension	2.5	72	1.25	72	1.25	72	1.25	72
Zyklen	30		30		30		30	
Finale Extension	10	72	10	72	10	72	10	72
Hold		4		4		4		4

4.7 Analytik und Aufreinigung der DNA nach PCR

4.7.1 Agarosegelelektrophorese

Die qualitative Analyse der amplifizierten Gene erfolgt durch Auftrennung der linearen DNS-Fragmente an Agarosegelen unter Anlegen einer elektrischen Spannung. Dafür wurde das Wide Mini-Sub Cell GT Cell System (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung erfolgt in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1 %. Die Agarose wird in einem entsprechenden Volumen an 1 x TAE Puffer zur Lösung aufgeköcht und unter Zusatz von 10-12 µL Ethidiumbromidlösung ($c = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ in 1 x TAE) in eine vorbereitete Gelkammer mit eingesetztem Kamm erkalten gelassen. Es werden 15 µL der zu analysierenden Probe mit 3 µL Ladepuffer (50 mg Bromphenolblau, 10 mL Glycerin, 15 mL H₂O) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größendifferenzierung werden zusätzlich 5 µL 1 Kbp Leiter (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen und aufgetrennt. Die Elektrophorese wird bei 120 V durchgeführt. Nach der Auftrennung erfolgt die Dokumentation durch Fluoreszenz nach Anregung durch UV Strahlung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ in der Geldokumentationskammer (Vilber Transilluminator, Eberhardzell, Deutschland). Die Auswertung erfolgt mit der Software Vision Capt.

TAE 50 x		
242 g	Tris Base	
18.6 g	Na ₂ EDTA	
57 mL	Eisessig	
ad 1000 mL		
pH = 8		

4.7.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt entweder aus der PCR-Mischung oder durch Ausschneiden der entsprechenden Banden aus dem Agarosegel. Dabei wird das Herstellerprotokoll des Wizard[®] SV and PCR Clean Up System (Promega, Mannheim, Deutschland) befolgt.

4.8 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration aufgereinigter DNS-Fragmente sowie Plasmid-DNS wurde photometrisch (NanoVue, GE Healthcare Europa, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dafür wurden 2 μ L der Probe gegen Wasser als Referenz gemessen. Zusätzlich werden Kontaminationen durch Proteine oder Alkohol durch das Verhältnis der Absorptionen bei $\lambda = 260$ nm zu $\lambda = 280$ nm bestimmt. Für eine Weiterverarbeitung der Probe sollte dieser Quotient einen Wert von $OD_{260}/OD_{280} \geq 1.8$ nicht unterschreiten. Desweiteren gibt das Verhältnis der Messung bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 230$ nm eine Verunreinigung durch Polysaccharide, Salze oder organische Lösemittel an. Dieser Quotient sollte $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$ sein. Andernfalls wird die Probe erneut aufgereinigt und gemessen.

4.9 Klonierung

4.9.1 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England BioLabs[®] Inc. (Frankfurt a. M., Deutschland) bezogen. Der Verdau von DNS erfolgte jeweils in 30 μ L Ansätzen mit je 500 ng DNS für 2 Stunden bei 37°C. Es wurden je 1 μ L Restriktionsenzym verwendet und 3 μ L des vom Hersteller empfohlenen Puffers und sterilem Wasser. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Enzyme durch Hitze inaktiviert und mit dem Wizard[®] SV and PCR Clean Up System aufgereinigt.

4.9.2 Dephosphorylierung

Da für die Klonierung von CYP112 in pMal-c5X nur eine Restriktionsendonuklease verwendet wurde, wird zur Vermeidung von Religationen dieser nach der Restriktion durch Zugabe von 1 μ L alkalischer Phosphatase für 20 Min dephosphoryliert. Die Deaktivierung der Phosphatase erfolgt durch Hitze.

4.9.3 Ligation

Für einen Ligationsansatz wurden insgesamt 100 ng DNS verwendet. Dabei wurde der 3-fache Konzentrationsüberschuss an DNS-Insert zu linearisiertem Vektor benutzt. Die Ligation

erfolgte in einem Volumen von 20 μL unter Zusatz von 1 μL T₄-DNS Ligase, 2 μL T₄ Puffer und sterilem Wasser. Zunächst wurden DNS-Insert, Vektor und Wasser vorgelegt und für 5 Min. bei 45°C inkubiert. Anschließend wird für 1 Min. auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von Ligase und Puffer wird bei den in der Tabelle angegebenen Dauer und Temperaturen inkubiert. Die Ligase wird durch Erhitzen auf 65°C für 10 Min inaktiviert. Dieser Ansatz wird ohne weitere Aufreinigung für die Weiterverarbeitung verwendet.

	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur
CYP112-pMal-c5X	3 Stunden	22°C
CYP114-pMal-c5X	2 Stunden	22°C
CYP117-pMal-c5X	7 Stunden	20°C
Ferredoxin-pMal-c5X	2 Stunden	22°C

4.10 Transformation von *E. coli*

4.10.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Es werden 400 mL LB-Medium mit 1/100 Volumen einer frischen Übernacht-Kultur von *E. coli* BL21 DE3 beimpft. Die Kultur wird bei 37°C und 200 rpm inkubiert bis eine OD von 0.4-0.5 erreicht ist. Die Kultur wird in 50 mL Einheiten aliquotiert und 15 min auf Eis gelagert. Die Zellen werden runter zentrifugiert (15 min). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 50 mL eiskalter steriler Glycerin-Lösung (10 % w/w) resuspendiert. Anschließend wird wieder runter zentrifugiert, der Überstand verworfen und resuspendiert (insgesamt drei Mal). Im letzten Schritt wird das Zellpellet in 1 mL Glycerin-Lösung resuspendiert und in 50 μL Einheiten aliquotiert. Die Aliquots werden bei – 80°C gelagert.

4.10.2 Elektroporation

Es werden *E. coli* BL21 DE3 elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut. Je 1 μL Ligationsansatz werden mit den Zellen vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Transformation wird mit dem Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 1800 V durchgeführt. Nach dem Puls wird umgehend 1 mL LB-Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen werden anschließend auf Selektionsmedium (LB^{Amp}) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.10.3 Kolonie-PCR

Die Überprüfung auf positive Bakterienklone erfolgte zunächst durch Kolonie-PCR. Dafür werden 50 μL H_2O vorgelegt, ein kleiner Teil einer Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in Wasser suspendiert. Von dieser Suspension werden 45 μL in LB^{Amp} -Medium überführt und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ inkubiert. Die restlichen 5 μL der Bakteriensuspension werden zur Amplifizierung mittels PCR verwendet. Diese erfolgt in einem 25 μL Ansatz, wobei 12.5 μL Mastermix (Promega, Mannheim, Deutschland), je 0.5 μL pMal-c5X Sequenzierprimer, 2 μL DMSO (50 %, w/w) und 4.5 μL H_2O zugesetzt wurden. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

pMal-c5X Fwd SeqPrimer	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
pMal-c5X Fwd SeqPrimer	TGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC

	t	T [$^\circ\text{C}$]
Initiale Denaturierung	0.5	95
3-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	0.5	95
Annealing	0.5	53
Extension	1.5	72
Zyklen	25	
Finale Extension	10	72
Hold		4

Anschließend wurden die PCR-Produkte analysiert.

4.11 Expression rekombinanter Proteine

4.11.1 Expression des Ferredoxins

Eine Übernachtskultur von Fer-pMal-c5X in *E. coli* BL21 DE3 wird in frisches $\text{LB}^{\text{Amp}}+\text{Glc}$ Medium überimpft und bis zu einer $\text{OD} \sim 0.5$ bei 37°C inkubiert. Anschließend wird bei einer Expressionstemperatur von 28°C für 30 Min. äquillibriert. Es wird mit IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mM induziert und für weitere 4 Std. bei 28°C exprimiert.

4.11.2 Expression der Monooxygenasen CYP112, CYP114 und CYP117

Es wird je eine Übernachtskultur von CYP112-pMal-c5X, CYP114-pMal-c5X und CYP117-pMal-c5X in *E. coli* BL21 DE3 in frisches LB^{Amp}+Glc-Medium überimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD ~ 0.5 wird für 30 Min bei der in der Tabelle angegeben Expressionstemperatur äquillibriert. Nach Induktion mit IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mM und unter Zusatz von δ -Aminolävulinsäure (δ -ALA) (1 mM Endkonzentration) und Fe(II)Cl₂ (Endkonzentration 0.5 mM) wird für die in der Tabelle angegebene Dauer exprimiert. Für jedes Experiment wird je auch eine Kultur ohne Induktion von IPTG und ohne Zusätze von δ -ALA und Fe(II)Cl₂ parallel mit bearbeitet.

	Dauer	Expressionstemperatur
CYP112-pMal-c5X	14 Std.	20°C
CYP114-pMal-c5X	8 Std.	28°C
CYP117-pMal-c5X	14 Std.	20°C

4.12 Proteinextraktion und Aufreinigung

4.12.1 Zellaufschluss

Die Zellen werden bei 4°C und 6000 rpm für 30 Min. sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Deutschland). Die Überstände werden verworfen und die Zellen in eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen werden über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen in Eiswasser wird für 2 Min. bei 77% Pulsation sonifiziert (SONOPLUS HD2070, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Die aufgeschlossenen Zellen werden für 30 Min. bei 4°C und 6000 rpm sedimentiert. Bei Extraktion der Monooxygenasen wird während der Arbeitsvorgänge stets auf Eis gearbeitet.

4.12.2 Affinitätschromatographie

Die Abtrennung der Fusionsproteine aus dem Gesamtproteinextrakt wird mittels Affinitätschromatographie an Amyloseharz (New England BioLabs[®] Inc) durchgeführt. Es wird nach dem Protokoll des Anbieters gearbeitet, wobei der angegebene Säulenpuffer durch eiskalten PBS-Puffer ersetzt wird. Im ersten Schritt wird nach Befüllen der Säule mit 5 Säulenvolumen PBS-Puffer gewaschen. Auf die vorkonditionierte Säule wird der Gesamtproteinextrakt aufgegeben. Eine Flußrate von 1 mL Min⁻¹ wird dabei nicht

überschritten. Es wird mit 12 Säulenvolumen PBS-Puffer gewaschen, bevor zur Elution dem PBS-Puffer 10 mM Maltose zugegeben wird. Die Elutionsfraktionen werden mittels Bradford Assay auf Vorhandensein von Protein geprüft. Nach der Chromatographie werden proteinenthaltene Fraktionen mittels SDS-Page auf Gegenwart des jeweils gewünschten Fusionsproteins getestet. Das Amyloseharz wird nach Angaben des Herstellers regeneriert.

4.12.3 Spaltung des Fusionsproteins

Die Spaltung des Fusionsproteins wird mit der Protease Faktor Xa durchgeführt. Es wird in einem Verhältnis von Protease:Protein von 1:100 (w/w) gearbeitet. Für die Testansätze werden jeweils 50 µg Fusionsprotein eingesetzt. Die Inkubationen werden bei Raumtemperatur für 2 und 4 Stunden bzw. bei 4 °C für 48 Stunden durchgeführt. Anschließend wird die Spaltung mittels SDS-Page überprüft.

4.13 Analytik von Proteinen

4.13.1 SDS-Page

Die qualitative Überprüfung auf die Expression rekombinanter Fusionsproteine wird mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wird mit einem diskontinuierlichen Gel, bestehend aus einem Trenngel (12% Acrylamid) und Sammelgel (2 % Acrylamid), gearbeitet. Es werden zu 20 µL der Proteinfraction 20 µL Ladepuffer und 2 µL 2-Mercaptoethanol zugefügt. Die Mischung wird für 1 Min auf 90°C erhitzt. Je 30 µL der Proteinprobe werden auf das Gel aufgetragen. Als Vergleich wird pro Gel eine Tasche mit 15 µL Proteinmarker (Größenbereich: 14-212 kD, Roti®-Mark Standard, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) beladen. Die Elektrophorese wird in 1 x Laufpuffer bei 200 V für 40 Min durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine werden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Dafür wird das Gel für ca. 2 Std in der Färbelösung angefärbt. Nach ausreichender Färbung wird das Gel für 4-5 Std. in der Entfärbelösung entfärbt, wobei die Entfärbelösung nach 2 Std. erneuert wird.

Ladepuffer (2 x)		Laufpuffer (10 x)	
15 mL	1.0 M TRIS; pH =	10 g	SDS
12 mL	10 % SDS	30.3 g	Tris Base
30 mL	Glycerin	144.1 g	Glycine
1.8 mg	Bromphenolblau	1 L	H ₂ O
28 mL	H ₂ O		

Coomassie Färbung

Färbelösung		Entfärbelösung	
100 mL	Eisessig	50 mL	Eisessig
250 mL	Isopropanol	75 mL	EtOH
0.5 g	Coomassie Brilliant Blue	ad 1 L	H ₂ O
ad 1 L	H ₂ O		

4.13.2 Bradford-Test

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wird nach der Methode von Bradford^[260] durchgeführt. Es wird für den Konzentrationsbereich von 0.01 mg mL^{-1} – 1 mg mL^{-1} mit Rinderserumalbumin eine Kalibriergerade erstellt. Dafür werden je $20 \mu\text{L}$ Proteinprobe mit 1 mL Färbelösung nach Bradford versetzt, vermischt und nach exakt 5 minütiger Inkubation bei RT die Extinktion der Probe bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen. Als Referenz dient der Reagenzienblindwert ($20 \mu\text{L}$ PBS-Puffer (Isolationspuffer) mit 1 mL Bradford Reagenz vermischt). Die Konzentration an Gesamtprotein einer Probe wird aus der Regressionsgerade der Kalibrierreihe berechnet. Bei einer Extinktion außerhalb des Kalibrierbereichs wird die Probe entsprechend verdünnt oder aufkonzentriert und erneut gemessen.

Färbelösung nach Bradford	
100 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
50 mL	Ethanol
100 mL	Phosphorsäure (85 % w / v)
ad 1000 mL	H ₂ O

Der Farbstoff wird zunächst in Ethanol gelöst. Anschließend wird Phosphorsäure zugegeben und mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt. Die fertige Lösung wird durch einen Spritzenfilter ($0.2 \mu\text{m}$) filtriert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

IX. Literatur

- [1] VERORDNUNG (EG) Nr. 1907/2006 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. REACH VO, **2006**.
- [2] A. S. Wilson, E. L. Brown, C. Villa, N. Lynnerup, A. Healey, M. C. Ceruti, J. Reinhard, C. H. Previgliano, F. A. Araoz, J. Gonzalez Diez, T. Taylor, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 13322–13327.
- [3] T. S. Kaufman, E. A. Ruveda, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 876–907.
- [4] F. W. Sertuerner, *Ann. Phys.* **1817**, *57*, 183–202.
- [5] A. L. Demain, S. Sanchez, *J Antibiot* **2009**, *62*, 5–16.
- [6] J. Staunton, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1331–1335.
- [7] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730–765.
- [8] Z. Vaněk, Z. Hošťálek, M. Blumauerová, K. Mikulík, M. Podojil, V. Běhal, V. Jechová, *Pure Appl. Chem.* **1973**, *34*, 463–486.
- [9] A. Wild, V. Schmitt, *Biochemische und physiologische Versuche mit Pflanzen*. Für Studium und Unterricht im Fach Biologie, Springer, Berlin, **2012**.
- [10] M. Wurzenberger, W. Grosch, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1984**, *794*, 18–24.
- [11] M. Kai, K. Wenke, B. Piechulla, *Biol. Unserer Zeit* **2009**, *39*, 313–319.
- [12] J. S. Dickschat, H. B. Bode, T. Mahmud, R. Müller, S. Schulz, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5174–5182.
- [13] C. Höckelmann, F. Jüttner, *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 387–394.
- [14] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814.
- [15] M. A. Wani, K. Sanjana, D. M. Kumar, D. K. Lal, *J. Basic Microbiol.* **2010**, *50*, 110–114.
- [16] D. C. Robacker, C. R. Lauzon, X. He, *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1329–1347.
- [17] K. Yu, T. R. Hamilton-Kemp, D. D. Archbold, R. W. Collins, M. C. Newman, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 413–417.
- [18] C. C. Chen, C. T. Ho, *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 830–833.
- [19] S. Hahnke, N. L. Brock, C. Zell, M. Simon, J. S. Dickschat, T. Brinkhoff, *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 39–48.
- [20] H. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Lehrbuch Der Lebensmittelchemie*, Springer, **2001**.

- [21] W. Engel, W. Bahr, P. Schieberle, *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209, 237–241.
- [22] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145–2148.
- [23] K. D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 160–167.
- [24] A. Giorgi, S. Panseri, N. N. Masachchige Chandrika Nanayakkara, L. M. Chiesa, *J. Plant Biol.* **2012**, 55, 251–260.
- [25] M. A. Farag, C.-M. Ryu, L. W. Sumner, P. W. Paré, *Phytochemistry* **2006**, 67, 2262–2268.
- [26] N. L. Brock, C. A. Citron, C. Zell, M. Berger, I. Wagner-Döbler, J. Petersen, T. Brinkhoff, M. Simon, J. S. Dickschat, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 942–950.
- [27] H. Jelen, *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, 36, 263–267.
- [28] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 838–861.
- [29] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr. A* **1976**, 117, 285–294.
- [30] J. S. Dickschat, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 925–947.
- [31] J. S. Dickschat, H. Reichenbach, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 4141–4153.
- [32] J. S. Dickschat, E. Helmke, S. Schulz, *Chemistry & Biodiversity* **2005**, 2, 318–353.
- [33] T. Nawrath, J. S. Dickschat, B. Kunze, S. Schulz, *Chemistry & Biodiversity* **2010**, 7, 2129–2144.
- [34] J. S. Dickschat, S. Wickel, C. J. Bolten, T. Nawrath, S. Schulz, C. Wittmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 2687–2695.
- [35] N. L. Brock, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2667–2676.
- [36] C. A. Citron, S. M. Wickel, B. Schulz, S. Draeger, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, n/a.
- [37] S. M. Wickel, C. A. Citron, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, n/a.
- [38] N. L. Brock, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1189–1193.
- [39] S. Schulz, J. Fuhlendorff, J. L. M. Steidle, J. Collatz, J.-T. Franz, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1500–1507.
- [40] S. P. Chinta, S. Goller, J. Lux, S. Funke, G. Uhl, S. Schulz, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 2077–2080.
- [41] S. Kinoshita, S. Udaka, M. Shimono, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1957**, 3, 193–205.
- [42] E. Stackebrandt, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey, *International Journal of Systematic Bacteriology* **1997**, 47, 479–491.
- [43] W. Leuchtenberger, K. Huthmacher, K. Drauz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 69, 1–8.
- [44] M. Inui, H. Kawaguchi, S. Murakami, Vertè, A. A. s, H. Yukawa, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 8, 243–254.
- [45] S. Sakai, Y. Tsuchida, S. Okino, O. Ichihashi, H. Kawaguchi, T. Watanabe, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 2349–2353.

- [46] J. Schneider, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 859–868.
- [47] B. Blombach, T. Riester, S. Wieschalka, C. Ziert, J.-W. Youn, V. F. Wendisch, B. J. Eikmanns, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3300–3310.
- [48] S. Wieschalka, B. Blombach, B. J. Eikmanns, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 449–459.
- [49] S. A. E. Heider, P. Peters-Wendisch, V. F. Wendisch, *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 198.
- [50] A. L. Demain, M. Jackson, N. R. Trenner, *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 323–326.
- [51] R. Wagner, M. Czerny, J. Bielohradsky, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1999**, *208*, 308–316.
- [52] D. C. Robacker, R. A. Flath, *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 1861–1874.
- [53] C.-J. Lee, A. B. DeMilo, D. S. Moreno, A. J. Martinez, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1348–1351.
- [54] I. Besson, C. Creuly, J. B. Gros, C. Larroche, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 489–495.
- [55] D. C. Robacker, R. J. Bartelt, *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 2897–2915.
- [56] H. C. Beck, A. M. Hansen, F. R. Lauritsen, *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *220*, 67–73.
- [57] S. Schulz, J. Fuhlendorff, H. Reichenbach, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3863–3872.
- [58] A. Gallois, A. Kergomard, J. Adda, *Food Chemistry* **1988**, *28*, 299–309.
- [59] K. E. Murray, F. B. Whitfield, *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 973–986.
- [60] M. Wüst, *Chemie in unserer Zeit* **2003**, *37*, 8–17.
- [61] J. W. Wheeler, M. S. Blum, *Science* **1973**, *182*, 501–503.
- [62] A. Woolfson, M. Rothschild, *Proc. Royal Soc. B* **1990**, *242*, 113–119.
- [63] B. Hölldobler, E. Morgan, N. J. Oldham, J. Liebig, *Journal of Insect Physiology* **2001**, *47*, 369–374.
- [64] A. T. Dossey, M. Gottardo, J. M. Whitaker, W. R. Roush, A. S. Edison, *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 861–870.
- [65] B. P. Moore, W. V. Brown, M. Rothschild, *Chemoecology* **1990**, *1*, 43–51.
- [66] B. W. Zilkowski, R. J. Bartelt, D. Blumberg, D. G. James, D. K. Weaver, *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 229–252.
- [67] E. D. Morgan, R. R. Do Nascimento, S. J. Keegans, J. Billen, *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1395–1409.
- [68] J. A. Maga, C. E. Sizer, *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 22–30.
- [69] C. Cerny, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 322–325.
- [70] K. Specht, W. Baltes, *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2246–2253.
- [71] V. Celia Resconi, M. del Mar Campo, F. Montossi, V. Ferreira, C. Sañudo, A. Escudero, *J. Food Sci.* **2012**, *77*, S240.

- [72] J. P. Walradt, A. O. Pittet, T. E. Kinlin, R. Muralidhara, A. Sanderson, *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 972–979.
- [73] R. G. Buttery, R. M. Seifert, D. G. Guadagni, L. C. Ling, *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 969–971.
- [74] H. A. Bondarovich, P. Friedel, V. Krampl, J. A. Renner, F. W. Shephard, M. A. Gianturco, *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 1093–1099.
- [75] F. L. Martin, J. M. Ames, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3885–3892.
- [76] C. Counet, D. Callemien, C. Ouwerx, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2385–2391.
- [77] T. Y. Kwon, J. Park, M. Y. Jung, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8514–8523.
- [78] D. S. Mottram, *Flavour and fragrances* **2007**, 269–283.
- [79] F. Ledl, E. Schleicher, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597–626.
- [80] P. V. Guerra, V. A. Yaylayan, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11440–11445.
- [81] H. Gutknecht, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1880**, *13*, 1116–1119.
- [82] F. P. Treadwell, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 2158–2161.
- [83] F. P. Treadwell, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 1461–1471.
- [84] I. J. Krems, P. E. Spoerri, *Chem. Rev.* **1947**, *40*, 279–358.
- [85] E. Zbiral, J. Storh, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *727*, 231–233.
- [86] G. Buechi, J. Galindo, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2605–2606.
- [87] A. Fürstner, A. Leitner, M. Méndez, H. Krause, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13856–13863.
- [88] B. D. Sherry, A. Fürstner, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1500–1511.
- [89] A. Fürstner, A. Leitner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 609–612.
- [90] B. Scheiper, M. Bonnekessel, H. Krause, A. Fürstner, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3943–3949.
- [91] A. Ohta, M. Ohta, *Synthesis* **1985**, 216–217.
- [92] Y. Nisikado, *Z. F. Parasitenkunde* **1932**, *4*, 285–300.
- [93] B. Brückner, D. Blechschmidt, *J. Basic Microbiol.* **1986**, *26*, 483–497.
- [94] C. Bömke, B. Tudzynski, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1876–1893.
- [95] R. H. Proctor, R. D. Plattner, D. W. Brown, J.-A. Seo, Y.-W. Lee, *Mycological Research* **2004**, *108*, 815–822.
- [96] D. Kjaer, A. Kjaer, C. Pedersen, J. D. Bu'Lock, J. R. Smith, *J. Chem. Soc., C* **1971**, 2792.

- [97] A. F. Barrero, J. F. Sánchez, J. Enrique Oltra, N. Tamayo, E. Cerdá-Olmedo, R. Candau, J. Avalos, *Phytochemistry* **1991**, 30, 2259–2263.
- [98] Z. Song, R. J. Cox, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1196–1203.
- [99] K. W. von Bargaen, E.-M. Niehaus, K. Bergander, R. Brun, B. Tudzynski, H.-U. Humpf, *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 2136–2140.
- [100] J. Ávalos, E. Cerdá-Olmedo, *Phytochemistry* **1986**, 25, 1837–1841.
- [101] A. Prado-Cabrero, A. F. Estrada, S. Al-Babili, J. Avalos, *Molecular Microbiology* **2007**, 64, 448–460.
- [102] N. L. Brock, K. Huss, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, 14, 311–315.
- [103] R. D. Hill, A. M. Unrau, D. T. Canvin, *Can. J. Chem.* **1966**, 44, 2077–2082.
- [104] C. W. Bacon, J. K. Porter, W. P. Norred, J. F. Leslie, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 4039–4043.
- [105] R. D. Stipanovic, M. H. Wheeler, L. S. Puckhaber, J. Liu, A. A. Bell, H. J. Williams, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5351–5356.
- [106] D. Voet, J. G. Voet, A. Maelicke, M. Börsch-Supan, *Biochemie*, VCH, Weinheim [u.a.], **1994**.
- [107] T. Evans, *J. Am. Chem. Soc.* **1900**, 22, 39–46.
- [108] G. R. Waller, S. S. Negi, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1958**, 35, 409–412.
- [109] G. Ohloff, *Fette, Seifen, Anstrichm.* **1955**, 57, 591–595.
- [110] A. Fürstner, A. Leitner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 308–311.
- [111] W. Aida, T. Ohtsuki, X. Li, M. Ishibashi, *Tetrahedron* **2009**, 65, 369–373.
- [112] U. Groenhagen, M. Maczka, J. S. Dickschat, S. Schulz, *Beilstein J Org Chem* **2014**, 10, 1421–1432.
- [113] N. Claydon, J. F. Grove, *Journal of Invertebrate Pathology* **1982**, 40, 413–418.
- [114] W. Pfrommer, K. Mendgen, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **1992**, 99, 209–217.
- [115] G. D. Henry, *Tetrahedron* **2004**, 60, 6043–6061.
- [116] A. Hantzsch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, 14, 1637–1638.
- [117] A. Hantzsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, 215, 1–82.
- [118] T. Chennat, U. Eisner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 926.
- [119] J.-J. V. Eynde, R. D'Orazio, Y. van Haverbeke, *Tetrahedron* **1994**, 50, 2479–2484.
- [120] S. H. Mashraqui, M. A. Karnik, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 4895–4898.
- [121] N. Nakamichi, Y. Kawashita, M. Hayashi, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3955–3957.
- [122] F. Bohlmann, D. Rahtz, *Chem. Ber.* **1957**, 90, 2265–2272.

- [123] M. Bagley, C. Glover, E. Merritt, *Synlett* **2007**, 2007, 2459–2482.
- [124] J. J. Song, N. K. Yee, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 605–608.
- [125] J.-D. Zhang, A.-T. Li, Y. Yang, J.-H. Xu, *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, 85, 615–624.
- [126] H.-Z. Zhang, S. Kasibhatla, J. Kuemmerle, W. Kemnitzer, K. Ollis-Mason, L. Qiu, C. Crogan-Grundy, B. Tseng, J. Drewe, S. X. Cai, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5215–5223.
- [127] R. J. Chambers, A. Marfat, *Synthetic Communications* **1997**, 27, 515–520.
- [128] G. G. Wu, Y. Wong, M. Poirier, *Org. Lett.* **1999**, 1, 745–747.
- [129] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2001**.
- [130] D. W. Brown, R. A. Butchko, M. Busman, R. H. Proctor, *Fungal Genetics and Biology* **2012**, 49, 521–532.
- [131] P. Curir, L. Guglieri, M. Dolci, A. Capponi, G. Aurino, *European Journal of Plant Pathology* **2000**, 106, 849–856.
- [132] VAAM International workshop 2012, Ed, *Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria and Fungi*, **2012**.
- [133] A. Schuster, M. Schmoll, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 787–799.
- [134] G. E. Harman, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, *Nat. Rev. Micro.* **2004**, 2, 43–56.
- [135] G. E. Harman, *Phytopathology* **2006**, 96, 190–194.
- [136] E. Monte, *Int. Microbiol.* **2001**, 4, 1–4.
- [137] S. Zeilinger, K. Brunner, C. K. Peterbauer, R. L. Mach, C. P. Kubicek, M. Lorito, *Current Genetics* **2003**, 43, 289–295.
- [138] J. L. Reino, R. F. Guerrero, R. Hernández-Galán, I. G. Collado, *Phytochem. Rev.* **2007**, 7, 89–123.
- [139] F. Vinale, R. Marra, F. Scala, E. L. Ghisalberti, M. Lorito, K. Sivasithamparam, *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, 43, 143–148.
- [140] M. Rollini, M. Manzoni, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 555–564.
- [141] A. Endo, K. Hasumi, A. Yamada R. Shimoda, H. Takeshima, *J. Antibiot.* **1986**, 39, 1609–1610.
- [142] A. Bruce, W. J. Austin, B. King, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1984**, 82, 423–428.
- [143] N. Stoppacher, B. Kluger, S. Zeilinger, R. Krska, R. Schuhmacher, *Journal of Microbiological Methods* **2010**, 81, 187–193.
- [144] Q. Huang, Y. Tezuka, Y. Hatanaka, T. Kikuchi, A. Nishi, K. Tubaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43, 1035–1038.
- [145] C. A. Citron, R. Riclea, N. L. Brock, J. S. Dickschat, *RSC Adv.* **2011**, 1, 290.
- [146] C. A. Citron, J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 7447–7450.

- [147] W. Legrum in *Riechstoffe, zwischen Gestank und Duft* (Ed. W. Legrum), Vieweg+Teubner, Wiesbaden, **2011**, pp. 83–116.
- [148] N. Kishimoto, S. Sugihara, K. Y. Mochida, T. Fujita, *Biocontrol. Sci.* **2005**, *10*, 31–36.
- [149] G. P. McGlacken, I. J. S. Fairlamb, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 369.
- [150] K. Suzuki, A. Kuwahara, H. Yoshida, S. Fujita, T. Nishikiori, T. Nakawakawa, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 314–317.
- [151] M. Kondoh, T. Usui, S. Kobayashi, K. Tsuchiya, K. Nishikawa, T. Nishikiori, T. Mayumi, H. Osada, *Cancer Letters* **1998**, *126*, 29–32.
- [152] S. Thaisrivongs, D. L. Romero, R. A. Tommasi, M. N. Janakiraman, J. W. Strohbach, S. R. Turner, C. Biles, R. R. Morge, P. D. Johnson, P. A. Aristoff, P. K. Tomich, J. C. Lynn, M.-M. Horng, K.-T. Chong, R. R. Hinshaw, W. J. Howe, B. C. Finzel, K. D. Watenpaugh, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4630–4642.
- [153] S. R. Turner, J. W. Strohbach, R. A. Tommasi, P. A. Aristoff, P. D. Johnson, H. I. Skulnick, L. A. Dolak, E. P. Seest, P. K. Tomich, M. J. Bohanon, M.-M. Horng, J. C. Lynn, K.-T. Chong, R. R. Hinshaw, K. D. Watenpaugh, M. N. Janakiraman, S. Thaisrivongs, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3467–3476.
- [154] F. Yong, H. Wong, G. Lim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*.
- [155] R. J. Horvat, G. W. Chapman, J. A. Robertson, F. I. Meredith, R. Scorza, A. M. Callahan, P. Morgens, *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 234–237.
- [156] K. H. Engel, R. A. Flath, R. G. Buttery, T. R. Mon, D. W. Ramming, R. Teranishi, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 549–553.
- [157] G. R. Takeoka, R. A. Flath, M. Guentert, W. Jennings, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 553–560.
- [158] R. P. Collins, A. F. Halim, *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 437–438.
- [159] G. Claydon, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1987**, 503–513.
- [160] P. R. Poole, K. J. Whitmore, *Postharvest Biology and Technology* **1997**, *12*, 229–237.
- [161] M. Moss, R. Jackson, D. Rogers, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2706–2708.
- [162] T. H. Jones, H. M. Fales, *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 5439–5440.
- [163] J. Rocca, J. Tumlinson, B. Glancey, C. Lofgren, *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 1889–1892.
- [164] A. Evidente, A. Cabras, L. Maddau, S. Serra, A. Andolfi, A. Motta, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6957–6960.
- [165] A. F. Barrero, J. E. Oltra, M. M. Herrador, E. Cabrera, J. F. Sanchez, J. F. Quílez, F. J. Rojas, J. F. Reyes, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 141–150.
- [166] A. Ichihara, H. Tazaki, S. Sakamura, *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 5373–5376.
- [167] A. Goel, V. J. Ram, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7865–7913.
- [168] J. D. Bu'Lock, H. G. Smith, *Experientia* **1961**, *17*, 553–554.

- [169] R. L. Edwards, D. G. Lewis, D. V. Wilson, *J. Chem. Soc.* **1961**, 4995.
- [170] W. Chen, L. Feng, Z. Huang, H. Su, *Chemico-Biological Interactions* **2012**, *199*, 137–142.
- [171] C. L. Bickel, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1022–1023.
- [172] W. Cao, W. Ding, R. Liu, T. Huang, J. Cao, *Journal of Fluorine Chemistry* **1999**, *95*, 135–140.
- [173] J. Thibonnet, M. Abarbri, J.-L. Parrain, A. Duchêne, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3941–3944.
- [174] J. K. Stille, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 504–519.
- [175] T. Luo, M. Dai, S.-L. Zheng, S. L. Schreiber, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2834–2836.
- [176] T. Luo, S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8250–8253.
- [177] L. Serrano-Carreón, Y. Hathout, M. Bensoussan, J. M. Belin, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 2945–2950.
- [178] B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 275.
- [179] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716.
- [180] E. Grienberger, S. S. Kim, B. Lallemant, P. Geoffroy, D. Heintz, C. d. A. Souza, T. Heitz, C. J. Douglas, M. Legrand, *The Plant Cell* **2011**, *22*, 4067–4083.
- [181] N. Funa, H. Ozawa, A. Hirata, S. Horinouchi, *PNAS* **2006**, *103*, 6356–6361.
- [182] P. Saxena, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 44780–44790.
- [183] C. Nakano, H. Ozawa, G. Akanuma, N. Funa, S. Horinouchi, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4916–4923.
- [184] L. Song, F. Barona-Gomez, C. Corre, L. Xiang, D. W. Udworthy, M. B. Austin, J. P. Noel, B. S. Moore, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14754–14755.
- [185] N. Funa, T. Awakawa, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14476–14481.
- [186] D. Yu, J. Zeng, D. Chen, J. Zhan, *Enzyme and Microbial Technology* **2010**, *46*, 575–580.
- [187] S. Melching, W. A. König, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 517–523.
- [188] E. Cantergiani, H. Brevard, Y. Krebs, A. Feria-Morales, A. Amado, C. Yeretizian *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 648–657.
- [189] A. Valla, F. Zentz, D. Cartier, R. Labia, *Nat. Prod. Lett.* **2000**, *14*, 417–423.
- [190] N. Chidambaram, K. Satyanarayana, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 2429–2432.
- [191] K. Yasui, Y. Goto, T. Yajima, Y. Taniseki, K. Fugami, A. Tanaka, Y. Tamaru, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 7619–7622.
- [192] P. V. Ramachandran, B. Prabhudas, J. S. Chandra, M. V. R. Reddy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6294–6304.
- [193] J. Llaveria, Á. Beltrán, M. M. Díaz-Requejo, M. I. Matheu, S. Castellón, P. J. Pérez, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7092–7095.

- [194] K. C. Nicolaou, R. E. Zipkin, R. E. Dolle, B. D. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3548–3551.
- [195] C. J. Simpson, M. J. Fitzhenry, N. P. J. Stamford, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 6893–6896.
- [196] P. R. Tondje, K. P. Hebbar, Samuels G, J. H. Bowers, S. Weise, E. Nyemb, D. Begoude, J. Foko, D. Fontem, A. J. B. **2006**, *5*, 648–652.
- [197] König, Wright, Aust, Draeger, Schulz, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 155–157.
- [198] C. M. Oliveira, L. O. Regasini, G. H. Silva, L. H. Pfenning, M. C. Young, R. G. Berlinck, V. S. Bolzani, A. R. Araujo, *Phytochemistry Letters* **2011**, *4*, 93–96.
- [199] S. Kusari, C. Hertweck, M. Spiteller, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 792–798.
- [200] S. Kusari, S. P. Pandey, M. Spiteller, *Phytochemistry* **2013**, *91*, 81–87.
- [201] K. Krohn, J. Dai, U. Flörke, H.-J. Aust, S. Dräger, B. Schulz, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 400–405.
- [202] T. Wang, P. Rabe, C. A. Citron, J. S. Dickschat, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2767–2777.
- [203] R. Timmer, R. Ter Heide, De Valois, Pieter J, H. J. Wobben, *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 53–56.
- [204] W. G. Jennings, M. R. Sevenants, *J Food Science* **1964**, *29*, 796–801.
- [205] C. J. Smith, D. Abbanat, V. S. Bernan, W. M. Maiese, M. Greenstein, J. Jompa, A. Tahir, C. M. Ireland, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 142–145.
- [206] S. Horinouchi, T. Beppu, *Critical Reviews in Biotechnology* **1990**, *10*, 191–204.
- [207] Y. J. Lee, S. Kitani, H. Kinoshita, T. Nihira, *Arch. Microbiol.* **2008**, *189*, 367–374.
- [208] C. Corre, S. W. Haynes, N. Malet, L. Song, G. L. Challis, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4079.
- [209] C. A. Citron, P. Rabe, J. S. Dickschat, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1765–1776.
- [210] R. Riclea, B. Aigle, P. Leblond, I. Schoenian, D. Spiteller, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1635–1644.
- [211] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden, Spektrum Akad. Verl, Berlin, **2009**.
- [212] F. C. Küpper, M. C. Feiters, B. Olofsson, T. Kaiho, S. Yanagida, M. B. Zimmermann, L. J. Carpenter, G. W. Luther, Z. Lu, M. Jonsson, L. Kloo, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11802–11825.
- [213] H. Togo, S. Iida, *Synlett* **2006**, *2006*, 2159–2175.
- [214] C.-G. Yang, N. W. Reich, Z. Shi, C. He, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4553–4556.
- [215] A. Ichihara, N. Nio, Y. Terayama, R. Kimura, S. Sakamura, *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 3731–3734.
- [216] Y. Waché, M. Aguedo, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 393–404.
- [217] J. B. Morin, K. L. Adams, J. K. Sello, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1517.
- [218] R. L. Edwards, A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 803.

- [219] M. W. Sumarah, E. Puniani, B. A. Blackwell, J. D. Miller, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1393–1398.
- [220] U. S. Gilles Grossmann, *Synlett*, **2001**, 278–280.
- [221] G. Grossmann, M. Poncioni, M. Bornand, B. Jolivet, M. Neuburger, U. Séquin, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3237–3251.
- [222] S. Mukherjee, E. J. Corey, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 632–635.
- [223] J. M. Whipps, *Journal of Experimental Botany* **2001**, *52*, 487–511.
- [224] G. Stacey, *FEMS Microbiology Letters* **1995**, *127*, 1–9.
- [225] T. Stępkowski, M. Zak, L. Moulin, J. Króliczak, B. Golińska, D. Narożna, V. I. Safronova, C. J. Mądrzak, *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34*, 368–375.
- [226] H. Hennecke, *FEBS Letters* **1990**, *268*, 422–426.
- [227] D. Werner, *Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen*. 88 Tabellen, Thieme, Stuttgart, **1987**.
- [228] L. Boiero, D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassán, V. Luna, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 874–880.
- [229] S. Yamaguchi, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 225–251.
- [230] A. Wild, V. Schmitt, *Biochemische und physiologische Versuche mit Pflanzen*, Springer, Berlin, **2012**, 331–363.
- [231] L. D. Wasilewska, J. Bralczyk, J. Szczegieliński, *Plant Science* **1987**, *53*, 11–19.
- [232] C. Rodrigues, L. P. d. S. Vandenberghe, J. de Oliveira, C. R. Soccol, *Critical Reviews in Biotechnology* **2012**, *32*, 263–273.
- [233] F. J. Gutierrez-Manero, B. Ramos-Solano, A. n. Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo, M. Talon, *Physiol. Plant* **2001**, *111*, 206–211.
- [234] R. Bottini, M. Fulchieri, D. Pearce, R. P. Pharis, *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 45–47.
- [235] R. Atzorn, A. Crozier, C. T. Wheeler, G. Sandberg, *Planta* **1988**, *175*, 532–538.
- [236] T. Kaneko, *DNA Research* **2002**, *9*, 189–197.
- [237] R. Tully, P. van Berkum, K. Lovins, D. Keister, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1998**, *1398*, 243–255.
- [238] C. Di Guana, P. Lib, P. D. Riggsa, H. Inouyeb, *Gene* **1988**, *67*, 21–30.
- [239] C. V. Maina, P. D. Riggs, A. G. Grandea, B. E. Slatko, L. S. Moran, J. A. Tagliamonte, L. A. McReynolds, d. G. Chu, *Gene* **1988**, *74*, 365–373.
- [240] K. Nagai, H. C. Thøgersen, *Nature* **1984**, *309*, 810–812.
- [241] I. Jansson, I. Stoilov, M. Sarfarazi, J. B. Schenkman, *Toxicology* **2000**, *144*, 211–219.
- [242] C. J. Jackson, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46959–46965.

- [243] T. Furuya, T. Nishi, D. Shibata, H. Suzuki, D. Ohta, K. Kino, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 563–572.
- [244] N. Frankenberg, J. Moser, D. Jahn, *J. Appl. Microbiol. Biotech.* **2003**, *63*, 115–127.
- [245] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, A. R. Howard-Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 517–531.
- [246] P. Duplay, H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin, M. Hofnung, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 10606–10613.
- [247] R. G. Berger, *Flavours and fragrances*. Chemistry, bioprocessing and sustainability, Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [248] A. Dunkel, M. Steinhaus, M. Kotthoff, B. Nowak, D. Krautwurst, P. Schieberle, T. Hofmann, *Angew. Chem.* **2014**, 2–24.
- [249] *Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG [Vgl. ändernd(e) Rechtsakte]*, **2003**.
- [250] R. Stipanovic, L. Puckhaber, J. Liu, A. Bell, *Toxicon* **2011**, *57*, 176–178.
- [251] R. Capasso, A. Evidente, A. Cutignano, M. Vurro, M. C. Zonno, A. Bottalico, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1035–1039.
- [252] N. Sato, M. Fujii, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1994**, *31*, 1177–1180.
- [253] D. Seebach, *Synthesis* **1969**, 17–36.
- [254] E. J. Corey, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1965**, *77*, 1134–1135.
- [255] P. Köhling, A. M. Schmidt, P. Eilbracht, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3213–3216.
- [256] R. Touati, V. Ratovelomanana-Vidal, B. B. Hassine, J.-P. Genêt, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3400–3405.
- [257] B. C. Holland, N. W. Gilman, *Synthetic Communications* **1974**, *4*, 203–210.
- [258] N. J. Hales, H. Heaney, J. H. Hollinshead, S. V. Ley, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7741–7754.
- [259] G. Bertani, *J. Bacteriol.* **1951**, *62*, 293–300.
- [260] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248–254.